

⑫ 公表特許公報 (A)

平4-505763

⑬ 公表 平成4年(1992)10月8日

⑭ Int. Cl. 5

C 07 K 1/04  
17/08  
G 01 N 33/53

識別記号

庁内整理番号

8318-4H  
7731-4H  
8310-2J ※

審査請求有  
予備審査請求有

部門 (区分) 3 (2)

(全 25 頁)

⑭ 発明の名称 非常に大規模な固定化ペプチド合成

⑮ 特 願 平2-508966

⑯ 出 願 平2(1990)6月7日

⑰ 翻訳文提出日 平3(1991)12月7日

⑱ 国際出願 PCT/NL90/00081

⑲ 国際公開番号 WO90/15070

⑳ 国際公開日 平2(1990)12月13日

優先権主張 ㉑ 1989年6月7日 ㉒ 米国 (U S) ㉓ 362,901

㉔ 発 明 者 バイアラング, マイケル シー. アメリカ合衆国, ノース キヤロライナ 27707, ダーラム, コツ  
トンウッド 3421

㉕ 出 願 人 アフイマックス テクノロジーズ オランダ領アンティル, キュラコ, デ リユイデルカデ 62  
ナムロゼ ベノートスハツブ

㉖ 代 理 人 弁理人 青 木 朗 外4名

㉗ 指 定 国 AT, AT (広域特許), AU, BB, BE (広域特許), BF (広域特許), BG, BJ (広域特許), BR, CA, CF  
(広域特許), CG (広域特許), CH, CH (広域特許), CM (広域特許), DE, DE (広域特許), DK, DK (広  
域特許), ES, ES (広域特許), FI, FR (広域特許), GA (広域特許), GB, GB (広域特許), HU, IT  
(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU, LU (広域特許), MC, MG, ML (広域特許), MR (広域特許),  
MW, NL, NL (広域特許), NO, RO, SD, SE, SE (広域特許), SN (広域特許), SU, TD (広域特許),  
TG (広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 基体上で配列を製造する方法であって、

a) 前記基体の第一領域をアクチベーターに暴露すること  
により保護基を除去する;

b) 少なくとも前記第一領域を第一モノマーに暴露する;

c) 第二領域をアクチベーターに暴露することにより保護  
基を除去する; 及び

d) 少なくとも前記第二領域を第二モノマーに暴露する;  
段階を含んで成る方法。

2. アクチベーターに暴露する前記段階が、イオンビーム、  
電子ビーム、γ線、X線、紫外線放射、光、赤外線放射、  
マイクロウェーブ、電流、ラジオ波、及びこれらの組合せか  
ら成る群から選択されたアクチベーターを使用する、請求項  
1 に記載の方法。

3. 前記保護基が感光性保護基である、請求項1に記載の  
方法。

4. アクチベーターに暴露する前記段階が前記基体の選択  
された領域に光を適用する段階である、請求項1に記載の方  
法。

5. 前記第一モノマー及び第二モノマーがアミノ酸である、  
請求項1に記載の方法。

6. 前記基体上の配列を受容体との親和性についてスクリ  
ーニングする段階をさらに含み、このスクリーニング段階が  
前記基体を前記受容体に暴露しそして前記第一領域及び第二

領域中の前記受容体の存在について試験する段階をさらに含  
んで成る、請求項1に記載の方法。

7. 前記受容体が抗体である、請求項6に記載の方法。

8. 前記基体が、重合したラングミアー・プロジェクト  
(Langmuir Blodgett) フィルム、官能化  
されたガラス、ゲルマニウム、シリコン、ポリマー、(ポリ)  
テトラフルオロエチレン、ポリスチレン、砒化ガリウム、及  
びこれらの組合せから成る群から選択されたものである、請  
求項1に記載の方法。

9. 前記保護基がオルト-ニトロベンジル誘導体、6-ニ  
トロベラトリルオキシカルボニル、2-ニトロベンジルオキ  
シカルボニル、シンナモイル誘導体、及びこれらの混合物か  
ら成る群から選択されたものである、請求項1に記載の方法。

10. 前記第一領域及び第二領域の各々が1cm<sup>2</sup>未満の全面  
積を有する、請求項1に記載の方法。

11. 前記第一領域及び第二領域の各々が約1μm<sup>2</sup>と10.  
000μm<sup>2</sup>との間の面積を有する、請求項1に記載の方法。

12. 前記光が単色干渉性光である、請求項4に記載の方  
法。

13. アクチベーターに暴露する前記段階が前記基体に接  
触した溶液と共に行われる、請求項1に記載の方法。

14. 前記溶液がさらに前記第一モノマー及び第二モノ  
マーを含んで成る、請求項13に記載の方法。

15. 前記受容体が更に放射性標識及び蛍光標識から成る  
群から選択された標識を含んで成り、そして受容体の存在を

試験する前記段階が前記領域を検出する段階である、請求項6に記載の方法。

16. アクチベーターに暴露する前記段階が、

a) ある波長の光に対して実質的に透過性の領域及び実質的に不透過性の領域を有するマスクを前記基体に隣接して置く；並びに

b) 少なくとも前記波長の光を生成する光源により前記マスクを照明する；

段階を更に含んで成る、請求項1に記載の方法。

17. 前記基体上で10<sup>3</sup>又はこれより多くの異なる配列を合成するように前記段階が反復される、請求項1に記載の方法。

18. 前記基体上で10<sup>6</sup>又はこれより多くの異なる配列を合成するように前記段階が反復される、請求項1に記載の方法。

19. 少なくとも第一モノマー及び第二モノマーを含んで成る複数の化学配列を合成する方法であって、

a) 少なくとも第一領域及び第二領域（該第一領域及び第二領域は基体保護基を含んで成る）を有する基体上の第一領域において、該第一領域を活性化することにより該第一領域中の前記基体保護基を除去する；

b) 前記第一モノマーを前記基体に暴露し、該第一モノマーは更に第一モノマー保護基を含んで成り、該第一モノマーは前記第一領域において結合する；

c) 前記第二領域を活性化することにより該第二領域中の

一は前記第一領域において結合する；

f) 前記第二領域中の前記保護基を除去する；

g) 前記第一領域を不活性化することにより該第一領域中に保護基を提供する；

h) 第三モノマーを前記基体に暴露し、該第三モノマーは前記第二領域において結合して第一配列を生成する；

i) 前記第一領域中の前記保護基を除去する；

j) 第四モノマーを前記基体に暴露し、該第四モノマーは前記第一領域において結合して第二配列を生成し、該第二配列は前記第一配列と異なる；

段階を含んで成る方法。

21. 基体上で少なくとも第一ポリマー配列及び第二ポリマー配列を合成する方法であって、該第一ポリマー配列は該第二ポリマー配列とは異なるモノマー配列を有し、

a) 前記基体とエネルギー源との間に第一マスクを挿入し、該マスクは第一領域及び第二領域を有し、該第一領域は前記エネルギー源からのエネルギーの通過を許容し、該第二領域は前記エネルギー源からのエネルギーを遮断する；

b) 前記エネルギー源からのエネルギーを前記基体に向け、該エネルギーが前記第一マスクの前記第一領域下の前記第一ポリマーの第一部分から保護基を除去する；

c) 前記第一ポリマーの第二領域を前記基体に暴露することにより第一ポリマー配列を生成せしめる；

d) 前記基体と前記エネルギー源との間に第二マスクを挿入し、該第二マスクは第一領域及び第二領域を有する；

前記基体保護基を活性化する；

d) 前記第二モノマーを前記基体に暴露し、該第二モノマーは更に第二モノマー保護基を含んで成り、該第二モノマーは前記第二領域において結合する；

e) 前記第一領域を活性化することにより前記第一モノマー保護基を除去する；

f) 第三モノマーを前記基体に暴露し、該第三モノマーは前記第一領域において結合して第一配列を生成する；

g) 前記第二領域を活性化することにより前記第二モノマー保護基を除去する；並びに

h) 第四モノマーを前記基体に暴露し、該第四モノマーは前記第二領域において結合して第二配列を生成し、該第二配列は前記第一配列と異なる；

段階を含んで成る方法。

20. 少なくとも第一モノマー及び第二モノマーを含んで成る複数の化学配列を合成する方法であって、

a) 少なくとも第一領域及び第二領域を有する基体上で該第一領域を不活性化することにより該第一領域中に第一保護基を提供する；

b) 前記第一モノマーを前記基体に暴露し、該第一モノマーは前記第二領域において結合する；

c) 前記第一領域中の前記保護基を除去する；

d) 前記第二領域を不活性化することにより該第二領域中に第二保護基を提供する；

e) 前記第二モノマーを前記基体に暴露し、該第二モノマ

e) 前記エネルギー源からのエネルギーを前記基体に向け、該エネルギーが前記第二ポリマーの第一部分から前記第二マスクの前記第一領域下の前記保護基を除去する；並びに

f) 前記第二ポリマーの第二部分を前記基体に暴露し、該第二ポリマーの該第二部分が該第二ポリマーの前記第一部分と結合して第二ポリマー配列を生成せしめる；

段階を含んで成る方法。

22. 受容体との結合について複数のアミノ酸配列をスクリーニングする方法であって、

a) 少なくとも第一表面（該少なくとも第一表面はニトロベラトリルオキシカルボニル及びニトロベンジルオキシカルボニルから成る群から選択された光保護材料を含んで成る）を有するガラス板上で、前記少なくとも第一表面を貯蔵のために $\epsilon$ -ブトキシカルボニルと反応せしめ、前記ガラス板は少なくとも紫外光に対して実質的に透過性である；

b) 前記少なくとも第一表面をTFAに暴露することにより前記 $\epsilon$ -ブトキシカルボニルを除去する；

c) 前記ガラス板を反応器に置き、該反応器は反応空間を含んで成り、前記少なくとも第一表面が該反応空間に暴露される；

d) 前記ガラス板上の第一位置にマスクを置き、該マスクは第一場所及び第二場所を含んで成り、該第一場所は少なくとも紫外光に対して実質的に透過性でありそして該第二場所は少なくとも紫外線に対して実質的に不透過性であり、該第二場所は前記マスクの第一表面上の光遮断材料を含んで成り、

該マスクの該第一表面は前記ガラス板と接触する；

e) 前記反応空間を反応溶液で充たす；

f) 前記マスクを少なくとも紫外光により照明し、該紫外光が前記マスクの前記第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

g) 前記第一表面を第一アミノ酸に暴露し、該第一アミノ酸は該少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、該第一アミノ酸はその末端に前記光保護基を含んで成る；

h) マスクを前記ガラス板と第二位置において接触せしめる；

i) 前記マスクを少なくとも紫外光により照明し、該紫外光が前記マスクの第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

j) 前記少なくとも第一表面を第二アミノ酸に暴露し、該第二アミノ酸は該少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、該第二アミノ酸はその末端に前記光保護基を含んで成る；

k) マスクを前記ガラス板と第三位置において接触せしめる；

l) 前記マスクを少なくとも紫外光により照明し、該紫外光が前記マスクの前記第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

m) 前記少なくとも第一表面を第三アミノ酸に暴露し、該第三アミノ酸は該少なくとも第一表面の前記光保護材料が除

去された領域に結合する；

n) マスクを前記ガラス板と第四位置において接触せしめる；

o) 前記マスクを少なくとも紫外線により照明し、該紫外線が前記マスクの前記第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

p) 前記少なくとも第一表面を第四アミノ酸に暴露し、該第四アミノ酸は該少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、該少なくとも第一表面は少なくとも第一、第二、第三、及び第四アミノ酸配列を含んで成る；

q) 前記少なくとも第一表面を注目の抗体に暴露し、該注目の抗体が前記第一、第二、第三又は第四アミノ酸配列の少なくとも1つにより強く結合する；

r) 前記少なくとも第一表面を受容体に暴露し、該受容体は前記注目の抗体を認識しそしてその複数の場所において結合し、該受容体はフルオレッセインを含んで成る；

s) 前記少なくとも第一表面に光を暴露し、該第一表面は少なくとも前記より強く結合したアミノ酸配列が位置する領域において蛍光を発する；並びに

t) 前記少なくとも第一表面を横切る場所に関数として蛍光の強度を検出及び記録する；

段階を含んで成る方法。

23. 受容体との結合について少なくとも1つのペプチド配列を同定する方法であって、

a) 各々が光除去可能な保護基を有する複数のポリペプチ

ドを有する基体上で、第一の選択されたポリペプチドを照射することによって前記保護基を除去する；

b) 前記ポリペプチドを第一アミノ酸と接触せしめることにより第一配列を生成せしめ、前記基体上の第二ポリペプチドは第二配列を含んで成る；及び

c) 前記第一配列又は第二配列のいずれが前記受容体と結合するかを同定する；

段階を含んで成る方法。

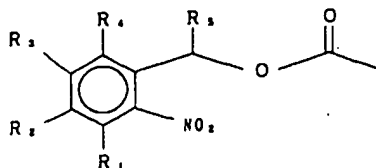
24. 複数のポリマーを製造するための装置であって、

a) エネルギー源への暴露に際して活性化されてモノマーと反応する反応性部分を含んで成る表面を有する基体；及び

b) 前記表面の部分を前記エネルギー源から選択的に保護及び暴露するための手段；

を含んで成る装置。

25. 前記反応性部分が更に保護基を含んで成り、該保護基が次の式：



(式中、R<sub>1</sub>はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、アリール、アルケニル又は水素であり；R<sub>2</sub>はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、アリール、ニトロ又は水素であり；R<sub>3</sub>はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、ニトロ、アリール又は水素であ

り；R<sub>4</sub>はアルコキシ、アルキル、水素、アリール、ハロゲン又はニトロであり；R<sub>5</sub>はアルキル、アルケニル、シアノ、アルコキシ、水素、ハロゲン、アリール又はアルケニルである)で表わされる、請求項24に記載の装置。

26. 前記反応性部分が更にリンカー分子を含んで成る、請求項24に記載の装置。

27. 前記リンカー分子がエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二酸、アミノ酸、及びこれらの組合せから成る群から選択されたものである、請求項26に記載の装置。

28. 選択的保護のための前記手段がさらにマスクを含んで成る、請求項24に記載の装置。

29. 前記選択的保護のための前記手段が更に光バルブを含んで成る、請求項24に記載の装置。

30. 前記エネルギー源が光源である、請求項24に記載の装置。

31. 前記反応性部分が更に、ニトロベラトリルオキシカルボニル、ニトロベンジルオキシカルボニル、ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル、5-プロモ-7-ニトロインドリニル、ヒドロキシ-2-メチルシナモイル、及び2-オキシメチレンアンスラキノンから成る群から選択された組成物を含んで成る、請求項24に記載の装置。

32. その上に複数のアミノ酸配列を有する基体の製造のための装置であって、

a) 表面を有する基体；

b) 光、電子ビーム及びX-線放射から成る群から選択さ

れたエネルギー源への暴露の際に除去され得る、前記表面上の保護基；

c) 前記表面上の選択された場所に前記エネルギー源を向けるための手段；並びに

d) 前記表面への結合のために該表面にアミノ酸を暴露するための手段；  
を含んで成る装置。

33. 表面を有する基体を含んで成るポリマーをスクリーニングするための装置であって、該表面は少なくとも2個のあらかじめ定められた領域を含んで成り、該あらかじめ定められた領域はその上に異なるモノマー配列を含み、該あらかじめ定められた領域の各々が約0.1  $\mu\text{m}^2$ 未満の面積を占めることを特徴とする装置。

34. 前記面積が約0.01  $\mu\text{m}^2$ 未満である、請求項33に記載の装置。

35. 前記面積が10000  $\mu\text{m}^2$ 未満である、請求項33に記載の装置。

36. 前記面積が100  $\mu\text{m}^2$ 未満である、請求項33に記載の装置。

37. 前記モノマー配列が前記あらかじめ定められた領域内で実質的に純粋である、請求項33、34、35又は36に記載の装置。

38. その表面上のあらかじめ定められた領域に10<sup>3</sup>又はそれより多くの異なるリガンドを含んで成る、生物学的活性についてスクリーニングするための基体。

成る第二表面とを有し、且つ少なくとも第一の波長の光に対して実質的に透過性である基体；

b) その内の反応流体空隙と共に載置表面を有する反応器体（前記第二表面が該載置表面と密封関係に維持される）；  
並びに

c) 前記基体の表面に向けられる、少なくとも前記の第一波長の光を発生するための光源；  
を含んで成る装置。

46. 基体上の蛍光標識された領域を検出するための装置であって、

a) 前記基体の表面に光をむけるための光源；

b) 前記光源にตอบสนองして前記表面から発生した蛍光を検出する手段；

c) 前記基体を第一位置から第二位置に移行するための手段；並びに

d) 前記基体上の場所の関数として蛍光強度を格納するための、前記移行手段及び前記検出手段に連絡された手段；  
を含んで成る装置。

39. 前記基体があらかじめ定められた領域内に10<sup>4</sup>又はそれより多くの異なるリガンドを含んで成る、請求項38に記載の基体。

40. 前記基体があらかじめ定められた領域内に10<sup>5</sup>又はそれより多くの異なるリガンドを含んで成る、請求項38に記載の基体。

41. 前記基体があらかじめ定められた領域内に10<sup>6</sup>又はそれより多くのリガンドを含んで成る、請求項38に記載の基体。

42. 前記リガンドがペプチドである、請求項38、39、40又は41に記載の基体。

43. 前記リガンドが前記あらかじめ定められた領域内で実質的に純粋である、請求項33に記載の基体。

44. 生物学的活性についてスクリーニングするための装置であって、

a) 複数のポリマー配列を含んで成る基体（該ポリマー配列は該基体上の既知の場所において該基体の表面に結合されており、該配列の各々は約0.1  $\mu\text{m}^2$ 未満の面積を占めている）；

b) 蛍光標識により標識されており前記配列の少なくとも1つと結合する受容体に前記基体と暴露する手段；並びに

c) 前記基体上の前記蛍光標識の場所を検出するための手段；  
を含んで成る装置。

45. 複数のポリマーを形成するための装置であって、

a) 少なくとも第一表面と光除去可能な保護材料を含んで

## 明 細 書

### 非常に大規模な固定化ペプチド合成

### 著 作 権 告 知

本特許文書の一部は著作権保護にゆだねられる内容を含む。本著作権者は本特許文書又は特許開示が米国特許商標庁の特許包袋中に存在する時いずれの者による複写再生に対しても異存はないが、その他の場合はいかなる場合もすべての著作権を留保する。

### 発 明 の 背 景

本発明は既知の場所における物質の合成及び配置に関する。特に、本発明の1つの態様は単一基体表面上の既知の場所における種々の化学配列の製造のための方法及び関連する装置を提供する。本発明は例えばオリゴマー、ペプチド、核酸、オリゴサッカライド、ホスホリビド、ポリマー又は薬剤同類調製物の製造の分野において、特に生物活性についてのスクリーニングにおいて使用するための化学的多様性の源を創製するために適用され得る。

構造と分子の活性との関係は生物学的系の研究における基本的な事項である。構造-活性関係は酵素の機能、細胞が相互に連絡し合う方法、並びに細胞制御及びフィードバック系を理解するために重要である。

ある種の巨大分子が、非常に特異的な三次元空間的及び電

子的分布を有する他の分子と相互作用しそして結合することが知られている。この様な特異性を有するすべての大分子は、それが代謝中間体の加水分解を触媒する酵素であるか、イオンの膜輸送を中介する細胞表面蛋白質であるか、近隣の細胞に対して特定の細胞を同定するのに役立つ糖蛋白質であるか、血漿中で循環しているIgGクラス抗体であるか、核内のDNAのオリゴヌクレオチド配列であるか等に拘らず、受容体(receptor)と考えることができる。受容体が選択的に結合する種々の分子はリガンド(ligand)として知られる。

既知の受容体及びリガンドの結合親和性を測定するために多くの測定方法が利用可能であるが、この様な実験から得られる情報は利用可能なリガンドの数及びタイプによりしばしば制限される。新規なリガンドは時として、偶然に、又はX-線結晶像分析及び蛋白質のための遺伝子組換え技法を含めて、分子構造の解明のための新たな技法の適用により発見される。

小ペプチドは構造と生物学的機能との間の関連性を探求するための例示的系である。ペプチドはアミノ酸の配列である。20種類の天然アミノ酸がポリマー分子に縮合されるとき、それらは広範囲の種類の三次元構造を形成し、それぞれは特定のアミノ酸配列及び溶剤条件に基く。20種類の天然アミノ酸の可能なペプチドの数は、例えば $20^3$ 又は3,200,000の異なるペプチドである。このサイズの分子が受容体結合研究において有用であるらしいことは、幾つかの抗体が数個のアミノ酸という短い配列を高い特異性をもって

認識することを示すエピトープ分析研究により支持される。さらに、アミノ酸の平均分子量は小ペプチドを、多くの現在有用な医薬製剤のサイズ範囲に置く。

医薬の発見は、構造-活性関係のこの様な研究に頼る研究の1つのタイプである。ほとんどの場合、生物学的に重要な受容体に対する特異性の望ましいパターンを有する新規なリガンドを発見する過程として、同時代的医薬研究を記載することができる。他の例は、農業において使用するための新規な化合物、例えば殺虫剤及び除草剤を発見するための研究である。

時として、リガンドを設計するための合理的な工程の解決は困難であり又は弾力性に欠けるものである。多数の異なるポリマーを調製するための従来の方法は、効果的で合理的な又はランダムなスクリーニングを可能にするのに十分な規模で用いられる場合、骨が折れるほど遅かった。例えば、固体支持体上でのペプチドの合成のためにメリフィールド(Merrifield)法(J. Am. Chem. Soc. (1963) 85: 2149-2154)が使用されている。メリフィールド法においてはアミノ酸が不溶性ポリマーから作られた支持体に共有結合される。 $\alpha$ -保護基を有する他のアミノ酸が、前記共有結合したアミノ酸と反応してジペプチドを形成する。洗浄の後、保護基が除去され、そして $\alpha$ -保護基を有する第三のアミノ酸が前記ジペプチドに加えられる。この工程は、所望の長さ及び配列のペプチドが得られるまで続けられる。メリフィールド法を用いる場合、1日に百を超えるペプチド配列を合成することは経

済的に実際的ではない。

より多数のポリマー配列を合成するため、ポリマー合成のための一連の反応容器を使用することも提案されている。例えば、試薬の自動化された逐次的付加により固相支持体上で直鎖状ポリマーを合成するためにチューブ状反応系を用いることができる。この方法はなお、効果的で経済的なスクリーニングのために十分なだけ多数のポリマー配列の合成を可能にしない。

多数の配列を調製するための方法が更に知られており、この方法においては孔状(foramorous)容器が既知量の反応性粒子を封入しており、この粒子は該容器の孔より大きなサイズを有する。この容器は所望の材料と選択的に反応して生成分子の所望の配列を合成することができる。当業界において知られている他の方法の場合と同様に、この方法は、効果的なスクリーニングのために十分に多様なポリペプチドを合成するために特に用いることができない。

他の技法も記載されている。これらの方法には、標準的マイクロタイタープレート的方式に合致する96個のプラスチックピン上でのペプチドの合成が含まれる。不都合なことには、これらの技法はある程度有用ではあるが実質的な問題点が残ったままである。例えば、これらの方法は、経済的に合成することができスクリーニングすることができる配列の多様性において制限されたままである。

以上のことから、知られた場所において種々の化学的配列を合成するための改良された方法及び装置が求められている。

## 発明の概要

種々のポリマーの合成のための改良された方法及び装置が開示される。

1つの好ましい態様においては、リンカー分子が基体上に与えられる。このリンカー分子の一端には、光除去可能な(photo removable)保護基により保護された反応性官能基が設けられる。リソグラフ(lithography)法を用いて、第一の選択された領域において、光除去可能な保護基が光に暴露されそしてリンカー分子から除去される。次に基体を洗浄し、又は単一モノマーと接触せしめる。この第一モノマーはリンカー分子上の露出された官能基と反応する。好ましい態様においては、モノマーはそのアミノ末端又はカルボキシ末端に光除去可能な保護基を含むアミノ酸であり、そしてリンカー分子は光除去可能な保護基を担持するアミノ基又はカルボキシ酸基を末端として有する。

次に、第二セットの選択された領域を光に暴露し、そしてリンカー分子/保護されたアミノ酸上の光除去可能な保護基を該第二セットの領域において除去する。次に、基体を、暴露された官能基との反応のために光除去可能な保護基を含有する第二モノマーと接触せしめる。所望の長さ及び所望の化学配列を有するポリマーが得られるまで選択的にモノマーを適用するためにその工程を反復する。次に、光感受性基を場合によっては除去し、そして次に配列を場合によってはキャップする。側鎖保護基が存在する場合はそれらも除去される。

本明細書に開示するリソグラフ法を用いることにより、基

体上の相対的に小さな且つ正確に知られた場所に光を向けることが可能である。従って、基体上の知られた場所において知られた化学配列のポリマーを合成することが可能である。

得られる基体は、例えば生物学的活性について多数のポリマーをスクリーニングすることを含めて種々の用途を有するであろう。生物学的活性をスクリーニングするためには、基体を1又は複数の受容体、例えば抗体、全体細胞、小胞上の受容体、脂質、又は他の種々の受容体のいずれかに暴露する。受容体は好ましくは例えば蛍光標識、放射能標識、又は受容体と反応性の標識された抗体により標識される。基体上の標識の位置は例えば光子検出法又はオートラジオグラフィ法により検出される。結合が検出される位置における物質の配列の知識を通して、どの配列が受容体を結合するかを迅速に決定することができ、そしてそれ故にこの技法を用いて多数のペプチドをスクリーニングすることができる。本発明の他の可能な用途には診断が含まれ、この場合、特定の受容体に対する種々の抗体が基体上に置かれ、そして例えば血清が免疫不全についてスクリーニングされるであろう。更なる用途には、例えば、半導体装置における有機物質の選択的「ドーピング」(doping)等が含まれる。

本発明の1つの観点に関して、ポリマーを合成するための選択された反応器系も開示される。この反応器系は、周辺付近で基体と適合する基体台を含む。この基体台は基体と該台との間に反応器空間を備えており、それを通して又はその中に反応流体がポンプ輸送され又は流れる。反応器空間中の基

体の選択された領域を脱保護するように、基体上にマスクが置かれ又は集中され、そして照明される。モノマーが反応器空間を通してポンプ輸送され又は基体と接触され、そして脱保護された領域と反応する。基体上の領域を選択的に脱保護し、そして反応空間を通して所定のモノマーを流すことにより、知られた場所において所望のポリマーを合成することができる。

改良された検出装置及び方法も開示される。この検出方法及び装置は、基体の表面上の知られた位置に非常に多様なポリマー配列を有する基体を用いる。基体は蛍光標識された受容体に暴露され、該受容体は1又は複数のポリマー配列と結合する。基体は、結合が起った位置の特定のために顕微鏡検出装置内に置かれる。この顕微鏡検出装置は基体に光を向けるための単色光源又は多色光源、基体からの蛍光を検出するための手段、及び蛍光の場所を決定するための手段を含む。基体上の蛍光を検出するための手段は幾つかの態様においては光子カウンターを含むであろう。蛍光の位置を決定するための手段は基体のためのx/y移動(translation)を含むであろう。スライドの移動及びデーターの収集は適切にプログラムされたデジタルコンピューターにより記録されそして受理される。

本発明の性質及び利点の更なる理解は本明細書の残りの部分及び添付された図面への言及により実現されるであろう。

#### 図面の簡単な説明

- 図1は、第一場所における基体のマスク及び照射を示す。  
基体は断面として示されており；  
図2は、モノマー「A」の適用後の基体を示し；  
図3は、第二場所における基体の照射を示し；  
図4は、モノマー「B」の適用後の基体を示し；  
図5は、「A」モノマーの照射を示し；  
図6は、「B」の第二の適用後の基体を示し；  
図7は、完成された基体を示し；  
図8A及び8Bは、基体上の複数のポリマーを形成するための反応器系のいずれか選択可能な具体例を示し；  
図9は、基体上の蛍光標識の位置を決定するための検出装置を示し；  
図10A～10Mは、モノマー「A」及び「B」のトリマーの製造に適用される場合の方法を示し；  
図11A、11B及び11Cは、標準的蛍光ビーズについての蛍光追跡線であり；  
図12A及び12Bは、それぞれ、光に暴露されていないNVOCスライド及び光に暴露されたNVOCスライドについての蛍光線であり；  
図13A及び13Bは、標識されたHerz抗体に暴露されたYGGFL及びGGFLのチェンカーボードパターンを有するスライドの形成を示し；そして  
図14A及び14Bは、2個の異なるガラススライド上で合成された16の配列のマッピングを示す。

#### 好ましい態様の詳細な説明

##### 目次

- I. 用語集
- II. 一般
- III. ポリマー合成
- IV. 反応器系の1態様の詳細
- V. 蛍光検出装置の1態様の詳細
- VI. 受容体の相対結合強度の決定
- VII. 実施例
  - A. スライドの調製
  - B. 「A」及び「B」の8種のトリマーの合成
  - C. アミノ保護基及び蛍光基のダイマーの合成
  - D. シグナルの可能性の証明
  - E. 単位面積当たり分子の数の証明
  - F. NVOCの除去及び蛍光標識の付加
  - G. NVOCの除去におけるマスクの使用
  - H. YGGFLの付加並びにこれに続くHerz抗体及びヤギ抗マウスへの暴露
  - I. YGGFLのモノマー並列形成及びこれに続く標識された抗体への暴露
  - J. YGGFL及びPGGFLのモノマー並列合成
  - K. YGGFL及びYPGGFLのモノマー並列合成
  - L. 16種類の異なるアミノ酸配列の並列の合成及びHerz抗体に対する相対結合親和性の評価
- VIII. 具体例の例示

## IX. 結 論

## 1. 用語集

次の用語は、これらが本明細書において使用される場合、下記の一般の意味を有する。

## 1. 相補的

リガンド分子及びその受容体の相互作用する表面の形態的 (topological) 適合性又は一致性に関する。すなわち、受容体とそのリガンドは相補的であると記述することができ、そしてそれ故にその接触表面特性は相互に相補的である。

## 2. エピトープ

抗体として知られる受容体のサブクラスとの相互作用領域により描写される抗原分子の部分

## 3. リガンド

リガンドは特定の受容体により認識される分子である。本発明により研究され得るリガンドの例には、限定的ではないが、細胞膜受容体に対するアゴニスト及びアンタゴニスト、毒素 (toxin 及び venom)、ウイルスエピトープ、ホルモン (例えば、鎮静剤、あへん剤、ステロイド等)、ホルモン受容体、ペプチド、酵素、酵素基質、補因子、薬物、レクチン、糖、オリゴスクレオチド、核酸、オリゴサッカライド、蛋白質、及びモノクローナル抗体が含まれる。

## 4. モノマー

一緒に連結してポリマーを形成することができる小分子のセットの構成質。モノマーのセットは限定的ではないが例え

## 7. 受容体

所与のリガンドに対する親和性を有する分子。受容体は天然分子でも人造分子でもよい。さらに、これらはその変化していない状態で又は他の種との凝集体として用いることができる。受容体は共有結合により又は非共有結合により、直接に又は特定の結合物質を介して結合員に付加され得る。本発明により使用され得る受容体の例には、限定的ではないが、抗体、細胞膜受容体、特定の抗原決定基 (例えばウイルス、細胞又は他の材料上にあるもの) と反応するモノクローナル抗体及び抗血清、薬物、ポリスクレオチド、核酸、ペプチド、補因子、レクチン、糖、ポリサッカライド、細胞、細胞膜、及びオルガネラが含まれる。受容体は時として当業界において抗-リガンドとも称される。本明細書において受容体なる用語が使用される場合、意味の相違は意図されない。2つの巨大分子が分子認識を介して結合して複合体を形成する場合、「リガンド受容体対」が形成される。

本発明により研究され得る受容体の他の例には次のものが含まれるが、これらに限定されない。

## a) 微生物受容体

微生物の生存に必須な特異的輸送蛋白質又は酵素のごとき、受容体に結合するリガンドの決定は新しいクラスの抗生物質において有用である。特に価値あるものは、日和見真菌、原生動物、及び現在使用されている抗生物質に対して耐性を有する細菌に対する抗生物質であろう。

ば通常のL-アミノ酸のセット、D-アミノ酸のセット、合成アミノ酸のセット、スクレオチドのセット、並びにペントース及びヘキソースのセットが含まれる。本明細書において使用する場合、モノマーはポリマーの合成のための基本セットのいずれかの構成員に関する。例えば、L-アミノ酸のダイマーはポリペプチドの合成のための400のモノマーの基本セットを構成する。モノマーの異なる基本セットはポリマーの合成における逐次段階で使用されるであろう。

## 5. ペプチド

モノマーがα-アミノ酸でありそしてアミド結合を介して一緒に結合しているポリマーであって、ポリペプチドとも称する。この明細書の文脈において、アミノ酸はL-光学異性体又はD-光学異性体であり得る。ペプチドは2より多くのアミノ酸モノマーの長さを有し、そしてしばしば20より多くのアミノ酸モノマーの長さを有する。アミノ酸のために標準的略号が用いられる (例えば、プロリンについてはP)。これらの略号はStryer, Biochemistry、第3版、1988に含まれており、これをすべての目的のために引用により本明細書に組み入れる。

## 6. 放射

例えば、電子ビーム放射、γ放射、X-線放射、紫外線放射、可視光、赤外線放射、マイクロウェーブ放射及びラジオ波を包含する10<sup>-14</sup>メートル及び10<sup>4</sup>メートルの間の波長を有するエネルギーを含めて、選択的に適用され得るエネルギー。「照射」とは、表面への放射の適用を意味する。

## b) 酵素

例えば、神経伝達物質の開裂を担当する酵素のごとき酵素の結合部位；異なる神経伝達物質を開裂せしめる酵素の作用を変更するある種の受容体に結合するリガンドの決定は、神経伝達の不全の治療において使用され得る薬剤の開発において有用である。

## c) 抗体

例えば、本発明は、注目の抗原のエピトープと結合する抗体分子上のリガンド結合部位の研究において有用であり、抗原性エピトープを模倣する配列の決定はワクチンの開発を導くことができ、該ワクチンの免疫原は1又は複数のこの様な配列に基き、あるいは前記決定は療法的処置において、例えば自己免疫疾患に対して (例えば「自己」抗体の結合をブロックすることにより) 有用な関連診断剤又は化合物の開発を導くことができる。

## d) 核酸

核酸の配列を合成してDNA又はRNA結合配列を樹立することができる。

## e) 触媒的ポリペプチド

1又は複数の反応体の1又は複数の生成物への転換を含む化学反応を促進することができるポリマー、好ましくはポリペプチド。この様なポリペプチドは一般に少なくとも1つの反応体又は反応中間体に対して特異的な結合部位、及び該結合部位の近くにある活性官能基を含み、この官能基は結合した反応体を化学的に変形することができる。触媒的ポリペ

チドは例えば米国特許出願No.404,920に記載されており、これをすべての目的のため引用により本明細書に組み入れる。

#### f) ホルモン受容体

例えば、インシュリン及び成長因子のための受容体。高い親和性をもって受容体に結合するリガンドの決定は、例えば、糖尿病の症状の救済のために糖尿病患者がとらなければならない日常的注射に代る経口投与の開発、及び他の場合、死体から又は組織換えDNA技法によってのみ得ることができる少いヒト成長ホルモン代替において有用である。他の例は血管収縮ホルモン受容体であり、受容体に結合するリガンドの決定は血圧を制御する薬剤の開発を導くであろう。

#### g) あへん(orphaine)受容体

脳におけるあへん受容体に結合するリガンドの決定はモルフィン及び関連薬剤の耽溺性の少ない代替物の開発において有用である。

#### 8. 基体

硬質又は半硬質表面を有する材料。多くの態様例においては基体の少なくとも1つの表面は実質的に平らであるが、幾つかの態様においては、異なるポリマーのための合成領域を例えばウエル、隆起した領域、エッチングされた溝等により物理的に分離するのが望ましい。他の具体例に従えば、合成の完了の後に放出される小ビーズを表面に備えることができる。

#### 9. 保護基

モノマーユニットに結合しており、そして電磁放射のごときアクチベーターへの暴露に際して空間的に除去される材料。

発明はこの明細書において主として、アミノ酸の配列を含む分子の製造に関して記載されるが、しかし他のポリマーの製造にも容易に適用することができる。この様なポリマーには、例えば、核酸の直鎖状及び環状ポリマー、ポリサッカライド、リン脂質、 $\alpha$ -、 $\beta$ -又は $\omega$ -アミノ酸を有するペプチド、上記のいずれかに既知の薬物が共有結合しているヘテロポリマー、ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリウレア、ポリアミド、ポリエチレンイミン、ポリアリーレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセテート、あるいはこの開示の概観の後に明らかになるであろう他のポリマーが含まれる。好ましい態様において、本発明はペプチドの合成に使用される。

調製された基体は、例えば、受容体との結合のためのリガンドとして種々のポリマーをスクリーニングするのに使用されるが、しかし本発明はリガンドと結合する受容体の合成のためにも使用することができる。この明細書に開示される基体は、広範な種類の他の用途を有するであろう。単に例として、本明細書において本発明は蛋白質に結合する核酸配列及びペプチド配列の決定、配列特異的結合薬剤の発見、抗体により認識されたエピトープの同定、並びに臨床的及び診断的用途並びに上記の組合わせのための種々の薬剤の評価において、使用され得る。

本発明は好ましくは、表面を有する基体「S」の使用を提供する。場合によっては基体の表面にリンカー分子「L」が与えられる。幾つかの態様において、リンカーの目的は合成

本発明において用途を有する保護基の例にはニトロベラトリルオキシカルボニル(Nitroveratryloxy carbonyl)、ニトロベンジルオキシカルボニル、ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル、5-ブromo-7-ニトロインドリニル、o-ヒドロキシ $\alpha$ -メチルシンナモイル、及び2-オキシメチレンアンスラキノンが含まれる。アクチベーターの他の例にはイオンビーム、電界、磁界、電子ビーム、X-線等が含まれる。

#### 10. 所定の領域

所定の領域とは、ポリマーの形成のために活性化されたか、活性化されているか、又は活性化されることが意図される表面上の位置決定された領域である。所定の領域は任意の便利な形状、例えば円形、長方形、楕円形、くさび形等を有することができる。本明細書において簡略化のため、「所定の領域」を時として単に「領域」と称する。

#### 11. 実質的に純粋

基体の1つの所定の領域がそれを他の所定の領域から区別する特性を示す場合、ポリマーは所定の領域内で「実質的に純粋である」と考えられる。典型的には純度は、均一な配列の結果としての生物学的活性又は機能として測定されるであろう。この様な特性は典型的には選択されたリガンド又は受容体との結合により測定されるであろう。

#### II. 一般

本発明は、複数の所定の領域に複数のポリマー配列を有する基体の調製及び使用のための方法及び装置を提供する。本

されたポリマーの受容体認識を促進することである。

場合によっては、リンカー分子は貯蔵の目的のために化学的に保護されていてもよい。幾つかの態様においてはt-BOC(t-ブトキシカルボニル)のごとき化学的貯蔵保護基を用いることができる。この様な化学的保護基は、例えば酸性溶液への暴露の後に化学的に除去され、そして貯蔵の間に表面を保護するために役立ちそしてポリマーの調製に先立って除去されるであろう。

基体又はリンカー分子の遠位末端に保護基P。を有する官能基が与えられる。保護基P。を放射、電界、電流又は他のアクチベーターへの暴露に際して除去して官能基を露出させることができる。

好ましい態様において、放射は紫外線(UV)、赤外線(IR)又は可視光である。後でさらに十分に記載するように、保護基は、電界の存在下で除去され得る電気化学的に感受性の基であることもできる。さらに他の態様においては、脱保護のためにイオンビーム、電子ビーム、等を使用することもできる。

幾つかの態様においては、暴露される領域、そしてそれ故に各異なるポリマー配列がその上で合成される範囲は約1 $\mu$ mより小さく又は1 $\mu$ m未満である。好ましい態様においては、暴露される範囲は約10,000 $\mu$ m未満であり、さらに好ましくは100 $\mu$ m未満であり、そして幾つかの態様においては単一分子と同様に少数のための結合部位を含むことができる。これらの領域内で、各ポリマーは好ましくは実質的に



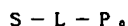
純粋な形で合成される。

光への基体の既知領域の暴露と同時に又はその後、表面を第一モノマーユニット $M_1$ と接触させ、このユニットは脱保護段階において露出された官能基と反応する。第一モノマーは保護基 $P_1$ を含有する。 $P_1$ は $P$ と同じでもよく又は異っていてもよい。

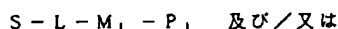
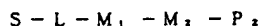
従って、第一サイクルの後、表面の既知第一領域は次の配列：



を含んで成り、他方表面の残りの領域は次の配列：



を含んで成る。次に、表面の第二領域（これは第一領域を含むことができる）を光に暴露し、そして保護基 $P_2$ を有する第二モノマー $M_2$ （これは $M_1$ と同一でもよく、又は異っていてもよい）と接触せしめる。 $P_2$ は $P$ 及び $P_1$ と同一でもよく、又は異っていてもよい。この第二サイクルの後、基体の異なる領域は次の配列：



の1又は複数を含んで成るであろう。基体が所望の長さの所望のポリマーを含有するまで上記の工程を反復する。光に暴露される基体の場所及び暴露に続き基体に暴露される試薬を制御することにより、各配列の場所が知られるであろう。

他の態様に従えば、第一モノマー層のために1セットのマスクが使用され、そして次に選択的脱保護のために種々の波長の光が用いられる。例えば、前に検討した工程において、第一領域をまずマスクを介して暴露し、そして第一波長の光（例えばIR）への暴露に際して除去され得る第一保護基 $P_1$ を有する第一モノマーと反応せしめる。第二領域をマスクし、そして第二波長の光（例えばUV）への暴露に際して除去され得る第二保護基 $P_2$ を有する第二モノマーと反応せしめる。この後、脱保護サイクルにおいて基体全体を第一波長の光及び第二波長の光に交互に暴露することができるから、合成においてマスクは不必要となる。

上記の方法に従って基体上で調製されたポリマーは、例えば生物学的活性のスクリーニングを含めて種々の用途を有するであろう。このようなスクリーニング活動において、配列を含む基体は、標識されていないか又は標識されている受容体、例えば抗体、細胞上の受容体、リン脂質小胞、又は他の種々の受容体のいずれかと接触される。1つの好ましい態様においては、ポリマーはまず注目の第一の未標識受容体に暴露され、そしてその後で、例えば抗体である標識された受容体特異的認識要素に暴露される。この方法は検出段階でのシグナルの増幅をもたらすであろう。

受容体分子は基体上の1又は複数のポリマーと結合することができる。標識された受容体の存在、そしてそれ故に該受容体と結合する配列の存在が好ましい態様においてはオートラジオグラフィーの使用、電荷カップリング（charge

次に、基体の残るか又は全部から保護基を除去し、そして場合によっては配列をキャップユニットCによりキャップする。この工程が、次の一般式：



（式中、中カッコ〔 〕は場合によっては存在する基を示し、そして $M_1\dots M_n$ はモノマーの任意の配列を示す）

により示される複数のポリマーを持つ表面を有する基体をもたらす。モノマーの数は広範囲の値にわたることができるが、しかし好ましい態様においてはそれは2〜100の範囲であろう。

幾つかの態様においては、基体上の複数の場所でポリマーは共通のモノマーサブ配列を含むべきである。例えば、第一の場所において配列 $S-M_1-M_2-M_3$ をそして第二の場所において配列 $S-M_4-M_5-M_6$ を合成することが望ましいであろう。この工程は第一の場所の照射をもって開始され、これに続く $M_1-P$ との接触が第一場所での配列 $S-M_1-M_2-M_3-P$ をもたらす。次に第二場所を照射しそして $M_4-P$ と接触させて第二場所での配列 $S-M_4-M_5-M_6-P$ を得る。次に、第一場所及び第二場所の両方を照射し、そしてダイマー $M_1-M_4$ と接触せしめることにより第一場所における配列 $S-M_1-M_2-M_3-M_4-M_5$ 、及び第二場所における配列 $S-M_4-M_5-M_6-M_1-M_2$ を得る。言うまでもなく、任意の長さのサブ配列を用いることができ、これには2以上の範囲のモノマー、2〜100個のモノマー、2〜20個のモノマー、そして最も好ましくは2〜3個の範囲モノマーが含まれる。

coupled) 装置による蛍光の検出、蛍光顕微鏡等により検出される。受容体の結合が検出される場所におけるポリマーの配列を用いて該受容体に対して相補的である配列の全部又は部分を決定することができる。

本明細書において本発明の利用は主として生物学的活性についてのスクリーニングに言及しながら説明される。しかしながら、本発明は他の多くの用途を有する。例えば、本発明は情報の格納（例えば、光ディスク上での）、分子電子装置の製造、分離科学（separation science）における定常相の生成、染料及び増白剤の製造、写真、並びに特異的ポリマー配列の分子認識を介しての表面上のパターンにおける細胞、蛋白質、レクチン、核酸、ポリサッカライド等の固定化、において使用することができる。同じ化合物を調製して段々と異なる濃度で合成することにより、走化性を制御するため又は例えば増加する量の抗原に対して抗体を力価検定する診断用浸漬棒（dipstick）を開発するために勾配が確立されるであろう。幾つかの触媒分子を近接して合成することにより、より効率的な多段階転換によって「座標固定化」（coordinate immobilization）が達成され得る。座標固定化はまた、電子伝達系のため、並びに構造的完全性及び他の好ましい性質、例えば清性、湿潤性等を与えるために用いることができる。

他の態様に従えば、分子生物分配及び薬理速度特性を試験することができる。例えば、腸プロテアーゼ又は血清プロテアーゼに対する耐性を評価するため、ポリマーを蛍光タグ

によりキャップし、そして注目の生物学的流体に暴露することができる。

### Ⅲ. ポリマー合成

図1はこの明細書に開示される本発明の1つの態様を示し、ここでは基体2が断面として示される。本質的に、任意の便利な基体を本発明において使用することができる。基体は生物学的、非生物学的、有機、無機、又はこれらの任意の組合わせであることができ、粒子、ストランド、沈澱、ゲル、シート、チューブ、球状体、容器、毛細管、パッド、スライス、フィルム、プレート、スライド等として存在する。基体は任意の便利な形態、例えばディスク、正方形、円等であることができる。基体は好ましい平らであるが、他の種々の表面構造を取るであろう。例えば、基体はその上で合成が行われる隆起した又はくぼんだ領域を含むことができる。基体及びその表面は好ましくは、本明細書に記載する反応がその上で起る硬質の支持体を形成する。基体及びその表面はまた、適切な吸光特性を与えるように選択される。例えば、基体は、重合したラングミュア・プロジェクトフィルム (Langmuir Blodgett) フィルム、官能化されたガラス、 $\text{Si}$ 、 $\text{Ge}$ 、 $\text{GaAs}$ 、 $\text{GaP}$ 、 $\text{SiO}_2$ 、 $\text{SiN}_4$ 、改質シリコン、又は広範囲の種類のゲル又はポリマー、例えば (ポリ) テトラフルオロエチレン、(ポリ) ビニリデンジフルオリド、ポリスチレン、ポリマーボネート、又はこれらの組合せであることができる。他の基体材料はこの開示を概観した後に当業者にとって明らかであろう。好ましい態様にお

いて、基体は10Å未満の表面レリーフ特性を有する単結晶シリコン又は平らなガラスである。

幾つかの態様に従えば、基体の表面はよく知られた方法によりエッチングすることにより所望の表面特性を与える。例えば、溝、V形溝、メーサ (台地) 構造等の形成により、合成領域を突き当たる光の焦点内により密に置くことができ、蛍光源等からの集光の最大化のための反射「鏡」構造を備えることができる。

固体基体の表面は通常、常にではないが、基体と同じ材料で構成される。すなわち、表面は広範囲の種類の材料のいずれか、例えばポリマー、プラスチック、樹脂、ポリサッカライド、シリカもしくはシリカを基材とする材料、炭素、金属、無機ガラス、膜、あるいは前に挙げた基体材料のいずれかから構成され得る。幾つかの態様において、表面は、すでに引用した出願番号No.404,920の教示に従う基体の表面に堅く結合したかこまれた (caged) 結合員の使用を提供する。好ましくは、表面は反応性基を含み、この基はカルボキシル、アミノ、ヒドロキシル等であることができる。さらに好ましくは、表面は光学的に透明であり、そしてシリカ表面に見られるように表面  $\text{Si}-\text{OH}$  官能基を有するであろう。

基体の表面4は好ましくはリンカー分子6の層を有するが、リンカー分子は本発明の必須の要素ではないと理解されよう。リンカー分子は好ましくは、完成された基体中のポリマーが基体に暴露された分子と自由に接触することを許容するのに十分な長さを有する。リンカー分子は十分な暴露を提供する

ためには6~50原子の長さを有すべきである。リンカー分子は例えばアリアルアセチレン、2~10個のモノマーユニットを含むエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、ジアシド、アミノ酸、又はこれらの組合せであることができる。この開示に照らして他のリンカー分子を使用することもできる。

他の態様に従えば、ある種の受容体への合成されたポリマーの提出を改良するために、リンカー分子はそれらの親水性/疎水性特性に基いて選択される。例えば、親水性受容体の場合、該受容体が合成されたポリマーに一層密接に接近することを許容するように、親水性リンカー分子が好ましい。

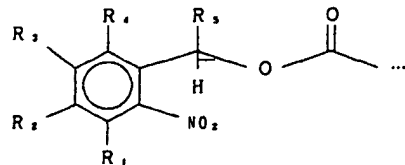
他の態様に従えば、リンカー分子はまた中間位置に光解裂性基を備える。この光解裂性基は好ましくは保護基とは異なる波長において開裂される。このことが、異なる波長の光への暴露による合成の完了後の種々のポリマーの取り出しを可能にする。

リンカー分子は、例えば (ポリ) トリフルオロクロロエチレン表面を用いて炭素-炭素結合を介して、又は好ましくはシロキサン結合により (例えば、ガラス又は酸化珪素表面を用いて) 基体に付加することができる。基体の表面とのシロキサンの結合は、1つの態様においては、トリクロロシリル基を担持するリンカー分子の反応を介して形成される。リンカー分子は場合によっては指定された整列で、すなわち重合されたラングミュア・プロジェクトフィルム中のヘッドグループ (head group) の部分として取付けられる。

他の態様においては、リンカー分子は基体の表面に吸着される。

本発明において使用されるリンカー分子及びモノマーは、保護基が結合した官能基を備える。好ましくは、保護基は基体とは反対側のリンカー分子の遠位端又は末端に存在する。保護基は負の保護基 (すなわち、暴露の後にリンカー分子とモノマーとの反応性を低くする保護基) 又は正の保護基 (すなわち、暴露の後にリンカー分子とモノマーとの反応性を低くする保護基) のどちらでもよい。負の保護基の場合、反応性化の追加の段階が必要であろう。幾つかの態様においては、それは加熱により行われるであろう。

リンカー分子上の保護基は広範囲の種類の正の光反応性基から選択することができ、これには好ましくはニトロ芳香族化合物、例えば *o*-ニトロベンジル誘導体又はベンジルスルホンルが含まれる。好ましい態様において、6-ニトロベラトリルオキシカルボニル (NVOC)、2-ニトロベンジルオキシカルボニル (NBVC) 又は  $\alpha$ 、 $\alpha$ -ジメチル- $\gamma$ -メトキシベンジルオキシカルボニル (DDZ) が使用される。1つの態様においては、ニトロ基に対してオルト位にベンジル性水素を含有するニトロ芳香族化合物、すなわち、次の式：



(式中、R<sub>1</sub> はアルコキシ、アルキル、ハロ、アリール、アルケニル又は水素であり；R<sub>2</sub> はアルコキシ、アルキル、ハロ、アリール、ニトロ又は水素であり；R<sub>3</sub> はアルコキシ、アルキル、ハロ、ニトロ、アリール又は水素であり；R<sub>4</sub> はアルコキシ、アルキル、水素、アリール、ハロ又はニトロであり；そしてR<sub>5</sub> はアルキル、アルキニル、シアノ、アルコキシ、水素、ハロ、アリール又はアルケニルである)で表わされる化学物質が使用される。使用し得る他の物質には $\alpha$ -ヒドロキシ- $\alpha$ -メチルシンナモイル誘導体が含まれる。光除去可能な保護基は例えばPatchornik, *J. Am. Chem. Soc.* (1970) 92: 6333及びAmitら, *J. Org. Chem.* (1974) 39: 192に記載されている。これらを引用により本明細書に組み入れる。

他の態様においては、正の反応性基が溶液中の試薬との反応のために活性化される。例えば、5-ブプロモ-7-ニトロインドリン基は、カルボニルに結合する場合、420 nmの光への暴露の際に反応する。

第二の態様においては、リンカー分子上の反応性基は、シンナメート基を含めて広範囲の種類の負の光反応性基から選択される。

あるいは、反応性基は電子ビームリソグラフィー、X-線リソグラフィー、又は他の放射により活性化又は不活性化される。電子ビームリソグラフィーのための適当な反応性基にはスルホニルが含まれる。例えば電流源への暴露を含めて他の方法を使用することもできる。この開示に照らして他の反応性基及び活性化方法を使用することもできる。

*Phys. Lett.* (1977) 31: 426-428(これを引用により本明細書に繰り入れる)に記載されている様な干渉(interferometric)技法を用いることができる。

基体に当てられる光のコントラストを増強するため、幾つかの態様に従えば、マスクと基体との間にコントラスト増強材料を設けるのが好ましい。このコントラスト増強層は光により分解される分子、例えばキノンジアジド、又は注目の波長において一時的に漂白される物質を含んで成ることができる。物質の一時的漂白は、光が当てられた場所でのより大きな貫通を可能にし、これによりコントラストが増強されるであろう。あるいは、コントラストの増強は、クラッド形ファイバー束(cladded fiber optic bundle)により得ることができる。

光は常用の白熱源、レーザー、レーザーダイオード等からのものであることができる。非平行光源が使用される場合、基体への光の拡散を防止するため厚いマスク又は多層マスクを用いるのが好ましい。さらに、幾つかの態様においては、合成を制御するために異なる波長に対して感受性の基を用いることが望ましい。例えば、異なる波長に対して感受性の基を用いることにより、ポリマーの合成における枝位置を選択し又はあるマスキング段階を略すことができる。幾つかの反応性基をその脱保護のための対応する波長と共に表1に示す。

図1に示すように、連結分子は好ましくは、例えば、半導体工業において知られておりそして例えばSze, *VLSI Technology*, McGraw-Hill(1983)、及びMeadら、*Introduction to VLSI Systems*, Addison-Wesley(1980)(これらをすべての目的のために引用により本明細書に組み入れる)において知られているタイプのリソグラフィー技法を用いて、適切なマスク8を介して光に暴露される。光を、保護基を含む表面に、又は保護基の除去のために必要とされる光の波長に対して基体が透過性である限り基体の背後に向けることができる。図1に示す態様においては、光は保護基を含む基体の表面に向けられる。図1はこの様なマスク技法の使用を示し、これらの技法は領域10a及び10b中の連結分子を活性化しそして官能基を露出させるために正の反応性基に適用される。

マスク8は、1つの態様においては、不透明な材料の層により部分的に被覆された透明な支持体材料である。不透明材料の部分が除去され、不透明材料は所望の正確なパターンで支持体表面に残る。図1に示すように、マスク8は基体表面と直接に接触され、その上に投影され、又はそれに近づくられる。マスクの「開口部」は、光除去可能な保護基を基体から除去することが望まれる基体上の場所に対応する。常用の整合(alignment)技法を用いて整合を行うことができ、この場合、整合マーク(示してない)を用いて、事前のパターン化段階を伴うマスクが次々と正確に重層され、あるいはより複雑な技法が使用され得る。例えば、Flandersら、*'A New Interferometric Alignment Technique'*, *App.*

表 1

基	およその脱保護波長
ニトロベラトリルオキシカルボニル(NVOC)	UV(300-400nm)
ニトロベンジルオキシカルボニル(NBOC)	UV(300-350nm)
ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル	UV(280-300nm)
5-ブプロモ-7-ニトロインドリニル	UV(420nm)
$\alpha$ -ヒドロキシ- $\alpha$ -メチルシンナモイル	UV(300-350nm)
2-オキシメチレンアンスラキノ	UV(350nm)

本明細書においては、本発明を主として基体の選択された領域を照明するためのマスクの使用により説明するが、他の技法を用いることもできる。例えば、変調されたレーザー又はダイオード光源のもとで基体を翻訳することができる。この様な技法は例えば米国特許No.4,719,615(Peyrerら)に記載されており、引用によりこの明細書に繰り入れる。他の態様においては、レーザーガルバノメータースキャンナーが用いられる。他の態様においては、常用の液晶(本明細書で「光バルブ」と称する)又は光ファイバー光源上で又はそれらと接触して合成を行うことができる。液晶を適切に調節する(modulate)ことにより、光が基体上の選択された領域に接するように光を選択的に制御することができる。あるいは、光が選択的に当てられる一連の光ファイバーの末端で合成を行うことができる。光の暴露の場所を制御するための手段は当業者に明らかであろう。

基体は溶液（示してない）と接触して又は接触しないで照射されることができ、そして好ましくは溶液と接触して照射される。幾つかの態様に従えば、この溶液は、照射により生成した副生成物がポリマーの合成を妨害するのを防止する試薬を含有する。この様な副生成物には例えば二酸化炭素、ニトロソカルボニル化合物、スチレン誘導体、インドール誘導体、及びそれらの光化学反応の生成物が含まれよう。あるいは、溶液は基体の屈折率を整合させるための試薬を含有することができる。溶液に添加される試薬にはさらに、例えば、酸性もしくは塩基性の緩衝剤、チオール、置換されたヒドラジン及びヒドロキシルアミン、還元剤（例えばNADH）、又は所与の官能基と反応することが知られている試薬（例えば、アリールニトロソ+グリオキシル酸→アリールホルムヒドロキサメート+CO<sub>2</sub>）が含まれる。

照射段階と同時に又はその後、リンカー分子を洗浄し、あるいは図2中の領域12a及び12bに「A」で示される第一モノマーと接触せしめる。第二モノマーは、光に暴露された連結分子の活性化された官能基と反応する。好ましくはアミノ酸である第一モノマーはまた光保護基を備えている。モノマー上の光保護基は連結分子中に用いられた保護基と同一でも又は異っていてもよく、そして前記の保護基のいずれかから選択される。1つの態様においては、Aモノマーのための保護基は基NB OC及びNV OCから選択される。

その後、図3に示すように、先行するマスキング段階において保護されていた領域として示される領域14a及び

14b中のリンカー保護基を除去しそして官能基を露出するように位置変えされたマスクを用いて照射の工程を反復する。第一マスクの位置変えの1つの選択枝として、多くの態様において第二マスクが使用されるであろう。他の態様においては、幾つかの段階が複数の逐次段階における共通領域の照射をもたらすであろう。図3に示すように、照射された領域間の分離をもたらすのが望ましい。例えば、整列の許容のためには約1~5µmの分離が適当であろう。

次に、図4に示すように、基体を第二の保護されたモノマー「B」に暴露してB領域16a及び16bを生成せしめる。次に、A領域12a及びB領域16b上の保護基を除去しそして反応性基を露出するように基体を再びマスクする。基体を再びモノマーBに暴露し、図6に示す構造の形成をもたらす。ダイマーB-A及びB-Bが基体上に生成されている。

Aについて上に記載したのと同様の引き続く一連のマスキング及び接触段階（示してない）が図7に示す構造をもたらす。この方法は、B及びAのすべての可能なダイマー、すなわちB-A、A-B、A-A、及びB-Bをもたらす。

合成領域、及び各個々のポリマーの合成のための領域は任意のサイズ及び形状のものでよい。例えば、正方形、楕円形、長方形、三角形、円形、又はこれらの部分、並びに不規則な幾何学形状を使用することができる。冗長性の目的で単一の基体に2連の合成領域を適用することもできる。

1つの態様においては、基体上の領域12及び16は約1cdと10<sup>-10</sup>cdとの間の表面積を有するであろう。幾つかの

態様においては、領域12及び16は約10<sup>-1</sup>cd, 10<sup>-2</sup>cd, 10<sup>-3</sup>cd, 10<sup>-4</sup>cd, 10<sup>-5</sup>cd, 10<sup>-6</sup>cd, 10<sup>-7</sup>cd, 10<sup>-8</sup>cd又は10<sup>-10</sup>cd未満の面積を有する。好ましい態様においては、領域12及び16は約10×10µmと500×500µmとの間である。

幾つかの態様においては、単一の基体は10種類より多くのモノマー配列を支持し、そして好ましくは100種類より多くのモノマー配列を支持しており、但し幾つかの態様においては約10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>又は10<sup>8</sup>種類より多くの異なる配列が1つの基体に与えられる。言うまでもなく、モノマー配列が合成される基体の1領域内で、モノマー配列が実質的に純粋であることが好ましい。幾つかの態様において、基体の領域は少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の純度を有する。

幾つかの態様に従えば、生物学的活性の最初のスクリーニングを提供するために単一の領域内に意図的に幾つかの配列をもうけ、次に有意な結合を示す領域内の物質をさらに評価する。

#### IV. 反応器系の1つの態様の詳細

図8Aは、本発明の1つの観点に従って調製された基体上にポリマーを合成するための反応器系100の好ましい態様を示す。この反応器系はその表面上に空洞104を有する体部102を含む。好ましい態様においては空洞は約50~

1000µmの深さを有し、約500µmの深さが好ましい。

空洞の底には好ましくは隆起106の整列が設けられており、この隆起はこの図の平面に、及び図の平面に対して平行に伸びている。隆起は好ましくは約50~200µmの深さを有しそして約2~3mmの間隔を有する。隆起の目的はより良い混合のために乱流を生じさせることである。空洞の底部表面は、突き当たる光の反射を防止するために、好ましくは吸光性である。

基体112は空洞104の上方に載置される。基体にはその底部表面にそって、介在するリンカー分子を伴って又は伴わないでNV OCのごとき光除去可能な保護基が設けられる。この基体は好ましくは広いスペクトルの光に対して透過性であるが、しかし幾つかの態様においては当該保護基を除去する波長に対してのみ透過性である（例えば、NV OCの場合UV）。幾つかの態様において、基体は常用の顕微鏡ガラススライド又はカバースリップである。基体は好ましくは、適当な物理的支持を提供しながら可能な限り薄いものである。好ましくは、基体は1mm未満の厚さを有し、さらに好ましくは0.5mm未満の厚さを有し、さらに好ましくは0.1mm未満の厚さを有し、そして最も好ましくは0.05mm未満の厚さを有する。他の好ましい態様においては、基体は石英又はシリコンである。

基体及び体部は入口108及び出口160を除き空洞を封止するために役立つ。幾つかの態様においては、体部及び基体は1個又は複数個のガスケットによって封止のために適合

していてもよい。好ましい態様に従えば、体部は2個の同心ガasketを有し、そして介在する空間はガasketへの基体の適合を確保するために真空状態に維持される。

流体は、例えばエルデックス・ラボラトリーズ (Eldex Laboratories) により製造されたモデルNo B-120-Sでもよいポンプ116により前記入口を通して空洞にポンプ輸送される。選択された流体はポンプにより空洞に入り、該空洞を通過しそして出口から出て循環され、さらに再循環されるか又は廃棄される。幾つかの態様においては攪拌を助けるため反応器を超音波照射にかけ、及び/又は加熱してもよい。

基体112の上方にはレンズ120が設けられており、このレンズは例えば2インチ100mm焦点距離の熔融シリカレンズであってもよい。コンパクトな系のためには、光源124からの光を基体に向けてため反射鏡122を設けてもよい。光源124は例えば、オリエル (Oriol) により製造されそしてモデルNo 66024を有するXe (Hg) 光源であることができる。第二レンズ126はレンズ112と組合わされてマスクイメージを基体に投影する目的で設けることができる。リソグラフィのこの形態を本明細書において投影プリンティングと称する。この開示から明らかなように、幾つかの態様に従えば近接プリンティング (proximity printing) 等を用いることもできる。

光源からの光は、マスク128の結果として基体の選択された場所へのみに到達することが許される。マスク128は例

えば、その上にエッチングされたクロムを有するガラスライドである。1つの態様においてマスク128は透過性場所と不透性場所の格子を有する。この様なマスクは例えばフォト・サイエンス社 (Photo Sciences, Inc.) により製造されるであろう。光はマスクの透明領域を自由に通過するが、しかし他の領域においては反射されるか又は吸収される。従って、基体の選択された場合のみが光に暴露される。

前記のように、基体の領域を選択的に暴露するために常用のマスクに代えて光バルブ (LCD) を用いることができる。あるいは、マスクのコントラストの強化の目的で又は光が当てられる領域を限定する唯一の手段として、ショット・グラス社 (Schott Glass, Inc.) から入手できるように光ファイバーフェースプレート (fiber optic faceplate) を用いることができる。この様なフェースプレートは図8Aに示される反応器中の基体上又はそのすぐ上方に置かれるであろう。さらに他の態様においてはコントラストの増強のためにフライスアイ (flys-eyes) レンズ、テーバー形光ファイバーフェースプレート等を用いることができる。

光の波長より小さい領域の照射を得るためにさらに精巧な技法を用いることができる。例えば、好ましい態様に従えば、例えばマイクロビレットの先端の分子マイクロクリスタルにより光が基体に向けられる。この様な装置は Liebermanら「A Light Source Smaller Than the Optical Wavelength」, *Science* (1990) 247: 59-61 に記載されており、これをすべての目的のため引用により本明細書に組み入れる。

操作において、基体を空洞上に置き、そしてそれに対して封止する。基体を調製する工程のすべての操作は、主として又は全体として、保護基を除去する際の光範囲外の波長の光により照らされた室内で行われる。例えば、NVOCの場合、UV光をほとんど又は全く提供しない常用の暗室光により室が照らされるべきである。すべての操作は、好ましくはおよそ室温において行われる。

まず、脱保護流体 (モノマーを含まない) が空洞を通して循環される。この溶液は好ましくはジオキサン溶液中5mM硫酸であり、この溶液は露出されたアミノ基をプロトン化し続けるために役立ちそして光分解副生成物とのそれらの反応性を低下させる。この脱保護流体には、例えば、光を吸収しそして反射及び不所望の光分解を回避するために役立つN, N-ジエチルアミノ2, 4-ジニトロベンゼンのごとき吸収材料を含めることができる。

次に、スライドをマスクからの光路に配置して基体上の第1場所が照明されるようにし、そして次に脱保護する。好ましい態様においては、基体を約1~15分間照明する。好ましい照明時間は365nmの光で10~20mW/cm<sup>2</sup>にて約10分間である。光分解の後、例えば塩化メチレン中ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) の溶液により約5分間スライドを中和する (すなわち約7のpHにする)。

次に、第一モノマーを基体上の第一場所に置く。照射の後、スライドをはずし、ばらばらに処理し、そして流れセル中に再設置する。あるいは、好ましくはやはり保護基により保護

されている第一モノマーを含有する流体をポンプ116により空洞を通して循環させる。例えば、第一場所で基体にアミノ酸Yを結合させることが望まれる場合、アミノ酸Y (そのα-炭素に保護基を担持する) を、該モノマーを反応性にするために使用される試薬及び/又はキャリアと共に貯蔵容器118からポンプにより空洞を通して循環させ、そして該ポンプの入口に戻す。

好ましい態様においては、モノマーキャリア溶液は、第一溶液 (本明細書において溶液「A」と称する) 及び第二溶液 (本明細書において溶液「B」と称する) を混合することにより形成する。表2に溶液Aのために使用し得る混合物の例を示す。

表 2

代表的なモノマーキャリア溶液「A」

100mg	NVOCアミノ保護アミノ酸
37mg	HOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)
250μl	DMF (ジメチルホルムアミド)
86μl	DIEA (ジイソプロピルエチルアミン)

溶液Bの組成を表3に示す。溶液A及びBを混合し、そして室温にて約8分間反応せしめ、次に2μlのDMFにより希釈し、次に500μlをスライドの表面に適用するか、あるいは該溶液を反応系を通して循環させ、そして室温にて約2時間反応させる。次にスライドをDMF、塩化メチレン及びエタノールにより洗浄する。

表 3

代表的なモノマーキャリアー溶液「B」

250 $\mu$ l	D M F
111 mg	B O P (ベンゾトリアゾリル-n-オキシ ートリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート)

結合されるべきモノマーを含有する溶液が空洞を通過して循環する際、該アミノ酸又は他のモノマーはそのカルボキシ末端において、脱保護されている基体の領域上のアミノ基と反応するであろう。言うまでもなく、本発明を空洞を通してのモノマーの循環を用いて説明するが、スライドを反応器から取り外しそしてそれを適切なモノマー溶液に浸漬することによって本発明を実施することもできる。

第一モノマーの付加の後、次にこの第一アミノ酸を含有する溶液を系から排除する。アミノ酸の除去が保証される程十分な量 (例えば、空洞及びキャリアー管路の容積の約50倍) のDMF/塩化メチレンの循環の後、マスク又は基体を再配置しあるいは新たなマスクを使用して基体上の第二領域を光に暴露し、そして光124を第二の暴露のために用いる。これが基体上の第二領域を脱保護し、そしてこの方法を目的のポリマー配列が合成されるまで反復する。

次に、誘導体化された基体全体を、好ましくは例えば蛍光標識により標識された注目の受容体に暴露する。これは、該受容体の溶液又は懸濁液を空洞を通して循環させるが、又はスライドの表面をばらばらに接触せしめることにより行う。

のため、追加の抗体 (例えば、ヤギ-マウス-ヤギ) を用いてこの方法を反復することができる。

好ましい態様においては、順序付けられた一連のマスクが使用される。幾つかの態様においては、所与のモノマーセットの可能なポリマーのすべてを合成するために1個という少い数のマスクを使用することが可能である。

例えば、4種類の塩基から16種類すべてのジスクレオチドを合成することが望まれる場合、1  $\text{cm}^2$  平方の合成領域が各0.25  $\text{cm}^2$  幅の16個の箱に概念的に分けられる。第一マスクは箱の最左列を暴露し、ここではAが結合する。第二マスクは次の列を暴露し、ここではBが結合され、次にC列のたの第三マスクが使用され、そしてDのために最左列を暴露する最終マスクが用いられる。第一、第二、第三及び第四マスクは異なる場所に移動される単一マスクであることができる。

ダイマーの第二ユニットのためにこの方法は水平方向に反復される。この時、マスクはやはり0.25  $\text{cm}^2$  幅の水平の暴露を可能にする。反応領域の水平の4分の1を暴露するマスクを用いてA、B、C及びDが逐次結合される。得られる基体は4塩基の16種のダイマーすべてを含有する。

ジペプチドを含有するために用いられる8個のマスクは移動、又は回転により相互に関連している。実際に、それが適切に移動又は回転されれば1個のマスクを使用することができる。例えば、単一の透明領域を有するマスクを逐次使用して垂直列のそれぞれを暴露し、90°移動させ、そして次に水平の暴露のために逐次使用することができる。

受容体は、相補的配列を含む基体のある領域に優先的に結合するであろう。

抗体は、例えばPBS (リン酸緩衝液) 中約1%のBSA (ウシ血清アルブミン) 及び0.5% Tweenの溶液であることができる「スーパーカクテル」と一般に称されるものの中に典型的には懸濁される。抗体はスーパーカクテル緩衝液中に例えば約0.1~4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の最終濃度に希釈される。

図8Bは、図8Aに示す反応器の他の好ましい態様を示す。この態様に従えば、マスク128が基体に直接接触して置かれる。好ましくは、光の分散の効果を減少させるように、マスクのエッチングした部分を下に向けて配置される。この態様に従えば、マスクは基体に近接して置かれるので像影レンズ120及び126は必要でない。

この技法のシグナル対ノイズ比を高める目的で、本発明の幾つかの態様は、第一の標識されているか又は標識されていない受容体への基体の暴露、及びこれに続く、該第一受容体上の複数の部位に結合する標識された第二受容体 (例えば抗体) への暴露を用いる。例えば、第一受容体が第一の種の動物に由来する抗体であれば、第二受容体は該第一の種に関連するエピトープに向けられた第二の種に由来する抗体である。例えばマウス抗体の場合、マウス抗体上の複数の部位に結合させるために抗-マウスである蛍光標識されたヤギ抗体又は抗血清を用いて、各結合部位への単一マウス抗体の結合と比べて数倍の蛍光を得ることができる。更なるシグナルの増幅

表4及び表5は、第一レベルにおいて3種類の異なるモノマー、第二レベルにおいて4種類の異なるモノマー、及びストリップパターンの第三レベルにおける5種類の異なるモノマーを有する3モノマー (残基) のポリマー鎖の合成のための、それぞれマスクプログラム及びサンプルアウトプットの計画のためのQuick Basicの単純なコンピュータープログラムを提供する。プログラムのアウトプットは、セルの数、各マスク上の「strips」(光領域) の数、及びマスクの各暴露のために必要な移動の量である。

表 5

## Masking Strategy Outputs

```

Number of residues- 3
Residue 1      3 building blocks
Residue 2      4 building blocks
Residue 3      5 building blocks

Number of calls- 60

Mask for residue 1

Number of stripes- 1
Width of each stripe- 20
Stripe 1 begins at location 1 and ends at 20

For each of 3 building blocks, translate mask by 20 cell(s)

Mask for residue 2

Number of stripes- 3
Width of each stripe- 5
Stripe 1 begins at location 1 and ends at 5
Stripe 2 begins at location 21 and ends at 25
Stripe 3 begins at location 41 and ends at 45

For each of 4 building blocks, translate mask by 5 cell(s)

Mask for residue 3

Number of stripes- 12
Width of each stripe- 1
Stripe 1 begins at location 1 and ends at 1
Stripe 2 begins at location 6 and ends at 6
Stripe 3 begins at location 11 and ends at 11
Stripe 4 begins at location 16 and ends at 16
Stripe 5 begins at location 21 and ends at 21
Stripe 6 begins at location 26 and ends at 26
Stripe 7 begins at location 31 and ends at 31
Stripe 8 begins at location 36 and ends at 36
Stripe 9 begins at location 41 and ends at 41
Stripe 10 begins at location 46 and ends at 46
Stripe 11 begins at location 51 and ends at 51
Stripe 12 begins at location 56 and ends at 56

For each of 5 building blocks, translate mask by 1 cell(s)

```

© Copyright 1990, Affymax N.V.

表 4

## Mask Strategy Program

```

DEFINT A-Z
DIM b(20), w(20), l(500)
FS = "LPT1:"
OPEN FS FOR OUTPUT AS #1

jmax = 3      'Number of residues
b(1) = 3: b(2) = 4: b(3) = 5      'Number of building blocks for res 1,2,3
g = 1: lmax(1) = 1

FOR j = 1 TO jmax: g = g + b(j): NEXT j

w(0) = 0: w(1) = g / b(1)

PRINT #1, "MASK2.BAS ", DATE$, TIME$: PRINT #1,
PRINT #1, USING "Number of residues-%%": jmax
FOR j = 1 TO jmax
PRINT #1, USING "Residue %%      %% building blocks": j: b(j)
NEXT j
PRINT #1, "
PRINT #1, USING "Number of cells-%%": g: PRINT #1,

FOR j = 2 TO jmax
lmax(j) = lmax(j-1) + b(j-1)
w(j) = w(j-1) / b(j)
NEXT j

FOR j = 1 TO jmax
PRINT #1, USING "Mask for residue %%": j: PRINT #1,
PRINT #1, USING "Number of stripes-%%": lmax(j)
PRINT #1, USING "Width of each stripe-%%": w(j)
FOR l = 1 TO lmax(j)
a = 1 + (l-1) * w(j-1)
aa = a + w(j) - 1
PRINT #1, USING "Stripe %% begins at location %% and ends at %%": l: a: aa
NEXT l
PRINT #1,
PRINT #1, USING "For each of %% building blocks, translate mask by %%
cell(s)": b(j): w(j),
PRINT #1, : PRINT #1, : PRINT #1,
NEXT j

```

© Copyright 1990, Affymax N.V.

## V. 蛍光検出装置の1態様の詳細

図9は基体上の蛍光標識された受容体を検出するための蛍光検出装置を示す。基体112はx/y移動テーブル202の上に置かれる。好ましい態様においては、x/y移動テーブルはニューポート社(Newport Corporation)により製造されるモデル№PM500-A1である。x/y移動テーブルは、例えば適切にプログラムされたIBM PC/AT又はAT適合コンピューターであってもよい適切にプログラムされたデジタルコンピューター204に接続されそしてそれにより制御される。言うまでもなく、ここで例示のために使用するATコンピューターに代えて他のコンピューター系、特定の目的のハードウェア等を容易に用いることもできる。本明細書に記載する移動及びデータ収集機能のためのコンピューターソフトウェアは、例えばナショナル・インストルメント(National Instruments)によりライセンスされる「Lab Windows」(すべての目的のため引用により本明細書に組み入れる)を含めて、市販のソフトウェアに基いて提供され得る。

基体及びx/y移動テーブルは、1又は複数の対物レンズ208を含む顕微鏡206のもとに置かれる。幾つかの態様においてはスペクトロフィジックス(Spectraphysics)により製造されるモデル№2020-05アルゴンイオンレーザーであるレーザー210からの光(約488nm)が、約520nmより長い波長の光を通すがしかし488nmの光を反射するダイクロイックミラー(dichroic mirror)

207により基体に向けられる。ダイクロイックミラー207は例えばカール・ザイス(Carl Zeiss)により製造されるモデル№FT510である。次にこのミラーから反射された光は顕微鏡206に入り、この顕微鏡は例えばカール・ザイスにより製造されるモデル№Axioscop 20であることができる。基体上のフルオレセインでマスクされた物質は>488nmの光で蛍光を発し、そしてこの蛍光は顕微鏡により集められ、そして鏡を通過するであろう。次に、基体からの蛍光は波長フィルター209を通りそして次に開口板211を通るように向けられる。波長フィルター209は例えばメレス・グリオット(Melles Griot)により製造されるモデル№OG530であることができ、そして開口板211は例えばカール・ザイスにより製造されるモデル№477352/477380であることができる。

次に蛍光は、幾つかの態様においてはハママツにより製造されるモデル№R943-02である光増倍管212に入り、シグナルは前増幅器214において増幅され、そして光子が光子カウンター216によりカウントされる。光子の数はコンピューター204において場所の関数として記録される。例えば、前増幅器(214)はスタンホード・リサーチ・システムにより製造されるモデル№SR440であることができ、そして光子カウンターはスタンホード・リサーチ・システムにより製造されるモデルSR400であることができる。次に、基体を次の場所に移かし、そして工程を反復す

る。好ましい態様においては、データーは1~100 $\mu$ mごとに得られ、約0.8~10 $\mu$ mのデーター収集直径が好ましい。十分に高い蛍光を示す態様において、広視野照明を用いるCCD検出器が用いられる。

レーザーにตอบสนองして所与の領域から生ずる電子の数をカウントすることにより、蛍光標識された分子が位置する基体上の場所を決定することができる。次に、例えばその表面上に合成されたポリペプチドのマトリクスを有するスライドについて、ポリペプチドのどれが蛍光標識された受容体に対して相補的であるかを決定することができる。

好ましい態様に従えば、基体に当てられる光の強度及び時間は、蛍光放射を最大にしそしてバックグラウンドノイズを最小にすることによるシグナル対ノイズ比の改善のために、レーザー出力及びスキンステージ速度を変えることにより調節される。

検出装置を、本明細書においては主として、標識された受容体の検出に関して説明したが、本発明は他の分野でも用途を有するであろう。例えば、本明細書において開示される検出装置は触媒、DNA又は蛋白質のゲルスクランニング等の分野において使用することができるであろう。

#### VI. 受容体の相対結合強度の決定

本発明のシグナル対ノイズ比は十分に高く、リガンドに対する受容体の存在又は不存在が検出され得るのみならず、種々の配列に対する受容体の相対的結合親和性を決定することができる。

120 $\mu$ lの水及び120gの水酸化ナトリウムを含む95%エタノール1lから成るアルカリ浴にスライドを12時間浸漬する。次にスライドを流水で洗浄しそして空気乾燥し、そして95%エタノールの溶液で一度すすぐ。

次に、ガラス表面又はリンカー分子にアミノ基を付加する目的で、スライドを例えばアミノプロピルトリエトキシシランによりアミノ化する。しかし、この目的のためにオメガ官能化シランを用いることもできる。1つの態様においては、0.1%のアミノプロピルトリエトキシシランが用いられるが、10<sup>-7</sup>%~10%濃度の溶液を使用することができ、約10<sup>-7</sup>%~2%が好ましい。0.1%混合物は、100 $\mu$ lの95%エタノール/5%水混合物に100マイクロリッター( $\mu$ l)のアミノプロピルトリエトキシシランを加えることにより調製される。この混合物をおよそ周囲温度にてロータリースペーサー上で約5分間攪拌する。次に、500 $\mu$ lのこの混合物を各洗浄されたスライドの一方の側の表面に適用する。スライドをこの溶液からデカントし、そして例えば100%エタノールに浸すことにより3回すすぐ。

プレートが乾燥した後、これらを110℃~120℃の真空オーブンに約20分間入れ、そして次に室温にて約12時間アルゴン雰囲気中で硬化させる。次に、スライドをDMF(ジメチルホルムアミド)溶液に浸し、次に塩化メチレンにより十分に洗浄する。

次に、各アミノ基にNVOC-GABAを結合させるため、スライドのアミノ化された表面を、例えばDMF中NVOC

実際に、受容体は整列している幾つかのペプチド配列に結合するが、幾つかの配列には他の配列に対するよりも強く結合することが見出される。多くの受容体分子が強く結合したリガンドの領域中で結合するであろうから、強い結合親和性は強い蛍光又はラジオグラフィースIGNALにより証明されるであろう。前に、受容体に対する弱い結合親和性を有するリガンドを有する基体の特定の領域においては比較的小数の受容体分子が結合するため、弱い結合親和性は弱い蛍光又はラジオグラフィースIGNALによって証明されるであろう。従って、リガンドの相対結合アビディティ(avidity)(又は、1価相互作用の場合には親和性)を、該リガンドを含有する領域の蛍光又はラジオグラフィースIGNALの強度によって決定することが可能になる。

親和性についての半定量的データーもまた洗浄条件及び受容体の濃度を変えることにより得られるであろう。これは、例えば、既知のリガンド受容体対と比較することにより行われるであろう。

#### VII. 例

次の例は本発明の有効性を説明するために提供される。すべての操作は、特にことわらない限りおよそ周囲温度及び圧力において行われた。

##### A. スライドの調製

反応性基の結合の前に、好ましい態様においては顕微鏡スライド又はカバースリットのごときガラス製基体である基体を清浄にするのが好ましい。1つの態様に従えば、例えば

-GABA( $\gamma$ -アミノ酪酸)NHS(N-ヒドロキシサキシニミド)の30mM溶液約500 $\mu$ lに暴露する。

表面を、例えばDMF、塩化メチレン及びエタノールで洗浄する。

表面上のすべての未反応アミノプロピルシラン…すなわちNVOC-GABAが結合しなかったアミノ基…を、無水酢酸とビリジンの1:3混合物に1時間暴露することによりアセチル基によりキャップする(更なる反応を防止するため)。この残留キャッピング機能を行うことができる他の物質には無水トリフルオロ酢酸、蟻酸酢酸無水物、又は他の反応性アシル化剤が含まれる。最後に、スライドをDMF、塩化メチレン及びエタノールにより再度洗浄する。

##### B. 「A」及び「B」の8種のトリマーの合成

図10は、2-モノマーセット:Gly及びPhe(それぞれ、「A」及び「B」により示す)の8種のトリマーの可能な合成を示す。6-ニトロベアトリルオキシカルボキサミド(NVOC-NH)残基で終るシラン基を担持するガラススライドを基体として調製する。アミノ基においてNVOCにより保護されたgly及びpheの活性エステル(ペンタフルオロフェニル、OBt等を試薬として調製する。この例には関係ないが、モノマーセットのために側鎖保護基が必要な場合、これらは主鎖を保護するために使用される光の波長において光反応性であってはならない。

サイズnのモノマーセットについて、長さlのすべての可能な配列を合成するためにはn $\times$ lサイクルが必要である。



1つのサイクルは次のことから成る：

1. 次の残基が付加されるべき部位でのアミノ基の露出のための適当なマスクを通しての照射、及び脱保護の副生成物を除去するための適切な洗浄。

2. 段階1において特定された部位においてのみ反応するであろう単一の活性化されそして保護された（同じ光化学的に除去可能な基による）モノマーの添加、及び過剰の試薬を表面から除去するために適当な洗浄。

1つの態様においては、上記のサイクルは基体上の各場所が1つの残基により延長されるまでモノマーセットの各構成員について反復される。他の態様においては、次の場所への移行の前に幾つかの残基が1つの場所において次々と付加される。サイクル時間は一般にカップリング反応速度により制限され、今や自動化されたペプチド合成においては20分間と短い。場合によってはこの段階の後に、後剤の試薬のために整列を安定化するために保護基の付加を行う。ポリマーの幾つかのタイプ（例えばポリマー）のため、全表面の最終的脱保護（光保護側鎖基の除去）が必要かも知れない。

さらに詳しくは、図10Aに示すように、カラス20は領域22、24、26、28、30、32、34及び36を備える。図10Bに示すように領域30、32、34及び36をマスクし、そしてガラスを照射し、そして「A」（例えばgly）を含有する試薬に暴露し、図10Cに示す構造を得る。次に領域22、24、26及び28をマスクし、ガラスを照射し（図10Dに示すように）、そして「B」（例えば

phe）を含有する試薬に暴露して図10Eに示す構造を得る。図10Mに示される構造が得られるまで、示されるようにセクションを次々にマスク及び暴露して工程を進行させる。ガラスを照射し、そして場合によってはアセチル化により末端基をキャップする。示されるように、gly/pheのすべての可能なトリマーが得られる。

この例においては側鎖保護基の除去は必要でない。所望により、エタンジチオール及びトリフルオロ酢酸による処理によって側鎖の脱保護を行うことができる。

一般に特定のポリマー鎖を得るのに必要な段階の数は、

$$n \times l \quad (1)$$

により定義され、ここで

$n$  = モノマーのベースセット中のモノマーの数、及び

$l$  = ポリマー鎖中のモノマーユニットの数、

である。

他方、長さ $l$ の配列の合成される数は、

$$n^1 \quad (2)$$

である。

言うまでもなく、やはり $l$ より短い長さを有するポリマーの合成を含むであろうマスク法を用いることにより、一層大きな多様性が得られる。極端な例において、 $l$ より短いか又はそれと同じ長さを有するすべてのポリマーが合成されれば、合成されるポリマーの数は：

$$n^1 + n^{1-1} + \dots + n^1 \quad (3)$$

であろう。

### C. アミノプロピル基及び蛍光基のダイマーの合成

アミノプロピル基及び蛍光基のダイマーの合成において、基体として官能化されたドラポア（durapore）膜を用いた。ドラポア（drapore）膜はアミノプロピル基を有するポリビニリデンジフルオリドである。アミノプロピル基を、カルボニルクロリドとアミノ酸との反応によりDDZ基によって保護した。この反応は当業者によく知られた反応である。これらの基を担持する表面をTHFの溶液に入れ、そして1mmの不透明領域及び透明領域のチェッカーボードパターンを有するマスクに接触させた。マスクを約280nm以上の波長を有する紫外線に5分間、室温にて暴露した。但し、本発明の種々の態様において、広範囲の暴露時間及び温度を使用するのが適当である。例えば、1つの態様においては、-70℃～+50℃の工程温度において約1～5000秒の暴露時間を用いることができる。

1つの好ましい態様において、およそ周囲圧力における約1～500秒間の暴露時間が使用される。幾つかの好ましい態様においては、蒸発を防止するために周囲圧より高い圧が用いられる。

次に、膜の表面を約1時間、ランタニドのキレートに結合した活性エステルを含む蛍光標識により洗浄した。洗浄時間は数分間～数時間の広い範囲で異なるであろう。これらの物質は赤及び緑可視領域で蛍光を発する。フルオロポア（fluorophore）中活性エステルとの反応が完了した後、フルオロポアが結合した位置を、それらを紫外線に暴露し

必要とされるリングラフィー段階の最大数は一般に、モノマーの各「層」について $n$ であろう。すなわち、必要とされるマスクの総数（そして、それ故にリングラフィー段階の数）は $n \times l$ であろう。透過性マスク領域のサイズは合成のために利用され得る基体の面積及び形成されるべき配列の数に依存するであろう。一般に、合成領域のサイズは：

$$\text{合成領域のサイズ} = (A/S)$$

であり、ここで

Aは合成のために利用可能な全面積であり、そして

Sはこの全面積において望まれる配列の数である。

本明細書に開示されるフォトリソグラフィ技法を用いて、1つの基体上で数千又は数百万のオリゴマーを同時に製造するために前記の方法を容易に用い得ることを、当業者は理解するであろう。従って、この方法は、多数の例えばジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタもしくはオクタペプチド、又はより大きなペプチド（又は、対応してポリヌクレオチド）を特に試験するための可能性をもたらすであろう。

上記の方法は手動の例により本法を説明している。言うまでもなく、自動化法又は半自動化法を用いることもできよう。試薬の自動添加及び除去によって、必要とする試薬の容量を最小にしそして反応条件をより注意深く調節するために、基体を流れセル中に配置することができる。次々に用いるマスクは手動的又は自動的に適用することができる。

そして、赤及び緑の蛍光を観察することにより、可視化することができる。基体の誘導体化された領域はマスクのもののパターンに密接に対応することが観察された。

#### D. シグナル可能性の証明

シグナル検出の可能性が、フロー・サイトメトリー・スタンダーダ (Flow Cytometry Standard) により製造されたモデルNo 824 の低レベル標準蛍光ビーズキットを用いて証明された。このキットは、既知の数の蛍光分子が含まれた直径5.8  $\mu\text{m}$  のビーズを含む。

ビーズの1つを、最初シャッターが閉められたレーザーのフィールド中の図9に示すスキャンステージ上の証明フィールド中に置いた。証明フィールド中に置いた後、光子検出装置を作働させた。レーザービームはブロックされず、そして粒子ビームと相互作用し、これは次に蛍光を発した。7,000及び29,000のフルオレセイン分子で含まれたビーズの蛍光曲線をそれぞれ図11A及び図11Bに示す。各曲線上に、フルオレセイン分子を伴わないビーズについての追跡線も示してある。これらの実験は488nmの励起、100  $\mu\text{W}$  のレーザー出力を用いて行われた。光は40パワー、75NA対物レンズを通して焦点を結ばせた。

蛍光強度はすべての場合に高い値から始まり、そして次に指数的に減少した。強度の低下はフルオレセイン分子の光漂白 (photobleaching) によるものである。フルオレセイン分子を伴わないビーズの追跡線はバックグラウンドの差引のために用いられる。標識されたビーズ及び

非標識ビーズの間の最初の指数的低下の差を積分して光子カウントの全数を得、そしてこの数はビーズ当りの分子の数に関連する。従って、検出され得るフルオレセイン分子当り光子の数を推定することができる。図11に示す曲線について、この計算が示すところによれば、この計算はフルオレセイン分子当り約40~50個の光子の放射を示す。

#### E. 単位面積当り分子の数の決定

前記の方法に従って調製されたアミノプロピル化ガラス顕微鏡スライドを用いて該スライドの標識化密度を確立した。スライドの遊離アミノ末端を、該アミノ基と共有結合を形成するFITC (フルオレセインイソチオシアネート) と反応せしめた。次に、スライドをスキャンニングして、フルオレセイン分子当り光子の予想値を用いて、単位面積当り表面上の分子の数の計算を可能にする領域中に発生するフルオレセイン光子の数をカウントする。

その表面にアミノプロピルシランを有するスライドをDMF中FITCの1mM溶液におよそ周囲温度にて1時間すすいだ。反応の後、スライドをDMFで2回、そして次にエタノール、水、そして次に再度エタノールにより洗浄した。次に、それを乾燥し、そしてそれが試験され得る状態になるまで貯蔵する。

図11に示すのと同様な曲線を使用し、そして指数的減少シグナルのもとでの蛍光カウントを積分することによって、誘導体化後の表面上の遊離アミノ基の数を決定した。10<sup>3</sup> × 10<sup>3</sup> 約2 × 2nm<sup>2</sup> 当り1フルオレセインの標識化密

度を有するスライドは、アミノプロピルトリエトキシシランの濃度が10<sup>-3</sup>%~10<sup>-1</sup>%の間で異なる間に、再現性よく作ることができ決定された。

#### F. NVOCの除去及び蛍光標識の付加

NVOC-GABAを前記のようにして付加した。1個のスライドの全表面を光に暴露してγ-アミノ酪酸の末端の遊離アミノ基を露出した。次に、このスライド及び暴露されていない同じものをフルオレセインイソチオシアネート (FITC) に暴露した。

図12Aは光に暴露されなかったがしかしFITCに暴露されたスライドを示す。X軸の単位は時間であり、Y軸の単位はカウントである。追跡線はある量のバックグラウンド蛍光を含有する。もう一方のスライドを350nm広バンド照明に約1分間暴露し (12mW/cm<sup>2</sup>, ~350nm照明)、洗浄し、そしてFITCと反応させた。このスライドの蛍光曲線を図12Bに示す。蛍光レベルの大きな増加が観察され、これは、光分解がスライドの表面上の多数のアミノ基を蛍光マーカーの付加のために露出したことを示している。

#### G. NVOCの除去におけるマスクの使用

次の実験を0.1%アミノプロピル化スライドを用いて行った。Hg-Xeアーク灯からの光を、レーザー切除したガラス上クロムマスクを通して、基体を直接接合させることにより基体上に像形成した。

このスライドを12mWの350nm広バンド光により約5分間照明しそして次に1mM FITC溶液と反応させた。これ

をレーザー検出スキャンニングステージ上に置き、そして蛍光強度のポジションカラーコードの2元表示としてグラフをプロットした。種々のマスクを通して実験を多数回反復した。100 × 100  $\mu\text{m}$  マスク、50  $\mu\text{m}$  マスク、20  $\mu\text{m}$  マスク及び10  $\mu\text{m}$  マスクの蛍光パターンが示すところによれば、このリソグラフィ技法を用いてマスクパターンは少なくとも約10  $\mu\text{m}$  以上で区別される。

#### H. YGGLの付加、並びこれに続くHerz抗体及びヤギ抗マウスへの暴露

特定のポリペプチド配列に対する受容体が表面結合ペプチドに結合しそして検出されることを確立するために、Leuエンケファリンを表面に結合させそして抗体により認識させた。スライドを0.1%アミノプロピルトリエトキシシランにより誘導体化し、そしてNVOCにより保護した。裏面接触印刷 (backside contact printing) を用いて流れセル中のスライドを暴露するため500  $\mu\text{m}$  チェッカーボードを用いた。Leuエンケファリン配列 (H<sub>2</sub>N-チロシン、グリシン、グリシン、フェニルアラニン、ロイシン-COOH、あるいは本明細書においてYGGLと称する) をそのカルボキシ末端を介して、スライドの表面上の露出されたアミノ基に結合させた。ペプチドをBOP/HOBT/DIEAカップリング試薬と共にDMF溶液に加え、そして流れセルを通して2時間、室温にて再循環させた。

Herz抗体として知られる第一抗体をスライドの表面に

45分間、2  $\mu\text{g}/\text{m}$ にて、スーパーカクテル（この場合さらに1%BSA及び1%オバルブミンを含有する）中で適用した。次に、第二抗体、すなわちヤギ抗マウス・フルオレッセイン複合体を2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ でスーパーカクテル緩衝液中に加え、そして2時間インキュベートした。

この結果を、位置の間数としての蛍光強度としてプロットした。この像を10  $\mu\text{m}$ 段階でとり、そして次のことが示された。よく定義されたパターンで脱保護が行われ得るのみならず、(1)この方法は基体の表面へのペプチドの好結果のカップリングをもたらし、(2)結合したペプチドの表面は抗体との結合のために利用可能であり、そして(3)検出装置の能力は受容体の結合を検出するのに十分であった。

#### I. YGGFLのモノマー並列形成及びそれに続く標識抗体への暴露

交互の正方形におけるYGGFL及びGGFLのモノマー並列合成をスライド上チェッカーボードパターン中で行い、そして得られるスライドをHerz抗体に暴露した。この実験を図13A及び図13Bに示す。

図13Aにおいて、この場合はt-BOC（t-ブトキシカルボニル）で保護されているアミノプロピル基により誘導体化されたスライドを示す。スライドをTFAで処理してt-BOC保護基を除去した。次に、そのアミノ基においてt-BOC保護されているE-アミノカブロン酸をアミノプロピル基に連結した。アミノカブロン酸はアミノプロピル基と合成されるべきペプチドとの間のスペーサーとして機能する。

基体との直接接触（「近接プリント」）において使用された50  $\mu\text{m}$ マスクについての類似のパターンはより明瞭なパターンを与え、そしてチェッカーボードパターンの角は、マスクが基体に直接接触して置かれた結果として感動的であった（これは、この技法を用いての解像度の増加を反映している）。

#### J. YGGFL及びPGGFLのモノマー並列合成

図13に示したものに類似する50  $\mu\text{m}$ チェッカーボードマスクを用いての合成を行った。しかしながら、追加の連結段階を通して基体上のGGFL部位にPを加えた。保護されたGGFLをマスクを通して光に暴露し、そして次に、前記のようにしてPに暴露することによりPを付加した。従って、基体上の領域の半分はYGGFLを含有し、そして残りの半分はPGGFLを含有した。

この実験についての蛍光プロットが示すところによれば、領域はやはり、結合が起った領域と結合が起らなかった領域との間が容易に識別できる。この実験は、抗体が特定の配列を認識し得ること、及びこの認識が長さ依存的でないことを示した。

#### K. YGGFL及びYPGGFLのモノマー並列合成

本発明の機能可能性をさらに示すため、前記のような技法を用いて基体上に交互のYGGFL及びYPGGFLの50  $\mu\text{m}$ チェッカーボードパターンを合成した。得られる蛍光プロットが示すところによれば、抗体はYGGFL配列を明瞭に認識することができそしてYPGGFL領域には有意に結合しなかった。

スペーサーのアミノ末端を脱保護し、そしてNVOC-ロイシンに連結した。次に、スライド全体を12mWの325nm広バンド照明により照明した。次に、スライドをNVOC-フェニルアラニンと連結しそして洗浄した。スライド全体を再び照明し、そして次にNVOC-グリシンに連結しそして洗浄した。スライドを再び照明し、そしてNVOC-グリシンに連結して図13Aの最後の部分に示す配列を形成した。

次に、図13Bに示すように、スライドの交互の領域を500×500  $\mu\text{m}$ チェッカーボードマスクを用いる投影プリントを用いて照明し、こうしてグリシンのアミノ基を照明された領域においてのみ露出させた。次の連結化学反応段階を行うときNVOC-チロシンを加え、そしてそれを照明を受けた所においてのみ連結させた。次に、スライド全体を照明してすべてのNVOC基を除去し、照明された領域にYGGFLのチェッカーボードを残し、そして他の領域にGGFLを残した。Herz抗体（これはYGGFLを認識するがしかしGGFLを認識しない）を加え、次にヤギ抗マウス・フルオレッセイン複合体を加えた。

得られる蛍光スキャンは、Herz抗体により認識されない（そしてそれ故にヤギ抗マウス抗体・フルオレッセイン複合体との結合が存在しない）テトラペプチドGGFLを含む領域、及びYGGFLが存在する赤い領域を示した。YGGFLペプチドはHerz抗体により認識され、そしてそれ故に、照明された領域にはフルオレッセイン-結合ヤギ抗マウスが認識する抗体が存在する。

#### L. 一連の16種類の異なるアミノ酸配列の合成及びHerz抗体への相対結合親和性の評価

前記の技法に類似する技法を用いて、一連の16種類の異なるアミノ酸配列（4連反復）を2枚のガラス基体のそれぞれの上で合成した。スライドの全表面にわたって配列NVOC-GFLを付加することにより配列を合成した。次に、一連のマスクを用いて2層のアミノ酸を基体に選択的に適用した。各領域は0.25cm×0.0625cmの寸法を有していた。第一のスライドはL-アミノ酸のみを含むアミノ酸配列を含んでおり、そして第二のスライドは選択されたD-アミノ酸のみを含んだ。図14A及び図14Bはそれぞれ第一スライド及び第二スライド上の種々の領域のマップを示す。図14A及び図14Bに示されるパターンは各スライド上に4連反復させた。次に、スライドをHerz抗体及びフルオレッセイン-標識ヤギ抗マウスに暴露した。

L-アミノ酸のみを含有する第一スライドの蛍光プロットは赤い領域（強い結合、すなわち149,000カウント以上）、及び黒い領域（Herz抗体がほとんど又は全く結合しない、すなわち20,000カウント以下）を示した。配列YGGFLは明らかに最も強く認識された。配列YAGFL及びYSGFLもまた抗体の強い認識を示した。これに対して、残りの配列のほとんどが、ほとんど又は全く結合を示さなかった。スライドの4連の反復部分はそこに示される結合の量において非常に一貫していた。

D-アミノ酸スライドの蛍光プロットが示すところによれば

ば、YGGFL配列により最も強い結合が示された。YAGFL、YSGFL及びYPGFLに対しても有意な結合が検出された。残りの配列は抗体との低い結合を示した。配列YGGFLの低い結合効率が観察された。

表6は試験された種々の配列を相対蛍光の順に挙げている。これは相対結合親和性に関する情報を提供する。

表 6  
H e r z A b への見かけ上の結合

Ｌ－アミノ酸セット	Ｄ－アミノ酸セット
YGGFL	YGGFL
YAGFL	YAGFL
YSGFL	YSGFL
LGGFL	YPGFL
FGGFL	fGGFL
YPGFL	yGGFL
LAGFL	fAGFL
PAGFL	wGGFL
WGGFL	yaGGFL
	fPGFL
	waGGFL

#### Ⅶ. 他の態様の例示

本発明の他の態様に従えば、この方法は、表面への囲まれた(caged)結合員の結合を提供し、この結合員はその囲まれた形態において、他の潜在的に結合する種、例えば受

る(caging)基が不安定化し、これにより活性化された結合員を提出する。典型的なエネルギー源は光である。

表面上の結合員が一旦活性化された後、これらは受容体に付加され得る。選択される受容体はモノクローナル抗体、核酸配列、薬物受容体等であることができる。受容体は常にではないが通常、それを直接的又は間接的に結合員に付加することが可能なように調製することができる。例えば、結合員に対する強い結合親和性及び受容体又は受容体の結合体(conjugate)に対する強い親和性を有する特異的結合物質を用いて、所望により結合員と受容体との間の架橋として機能させることができる。この方法は、受容体が特定のリガンドに対するその活性を維持するように調製された受容体を用いる。

好ましくは、固体支持体に付加された囲まれた結合員は光活性化可能なビオチン複合体、すなわち、アビジン又はアビジン類似体に対して天然ビオチンに比べて有意に低下した結合親和性を有するように光活性化可能な保護基により化学修飾されているビオチン分子であろう。好ましい態様においては、表面の所定の領域に配置された保護基が適当な放射源の適用の際に除去されて結合員をもたらす、この結合員はビオチン、又はアビジンもしくはアビジン類似体に対してビオチンと実質的に同じ結合親和性を有する機能的に類似する化合物である。

他の好ましい態様においては、アビジン又はアビジン類似体が表面上の活性化された結合員と共に、該アビジンが該結

合体及び特異的結合基質に対する比較的低い親和性を有する。この様な技法は、1989年9月8日出願の係続中の出願No 404,920にさらに十分に記載されており、これをすべての目的のため引用により本明細書に組み入れる。

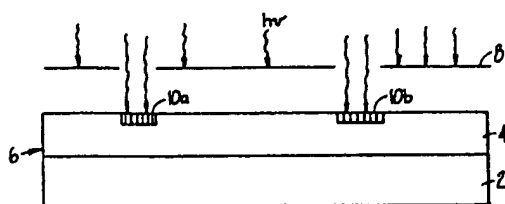
この態様に従えば、本発明は固体支持体の表面上の所定の領域を形成する方法を提供し、ここで、所定の領域は受容体を固定化することができる。この方法は、表面に結合された囲まれた結合員を使用し、所定の領域の選択的活性化を可能にする。囲まれた結合員は、所望の領域の選択的活性化の際に遊離されて最終的に受容体と結合することができる結合員として機能する。次に、活性化された結合剤を用いて受容体のごとき特定の分子を基体の所定の領域に固定化する。上記の方法を基体上の同一の又は異なる部位において反復し、例えば同一の又は異なる受容体を含有する表面上の複数の領域を有する表面を得る。こうして固定化された受容体が1又は複数のリガンドについて異なる親和性を有する場合、そのリガンドについてのスクリーニング及び測定を前記受容体を含有する表面の領域において行うことができる。

他の態様も基体に付加された新規な囲まれた結合員を用いることができる。囲まれた(不活性化された)構成員は、活性化された結合員の対応する親和性と比較した場合、囲まれていない結合員に特異的に結合する物質の受容体に対する比較的低い親和性を有する。従って、活性化されるべき表面の領域に適当なエネルギー源が適用されるまで、結合員は反応から保護される。適当なエネルギー源の適用の際、囲んでい

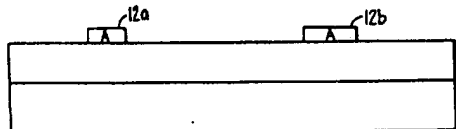
合員に強く結合するまでインキュベートする。次に、表面の所定の領域上に固定化されたアビジンを所望の受容体又は所望の受容体の結合体と主にインキュベートすることができる。アビジンが表面の所定の領域上に固定化される場合、受容体は好ましくはビオチン化され、例えばビオチン化抗体であろう。あるいは、好ましい態様は、あらかじめ調製されたアビジン/ビオチン化受容体複合体は、表面上の活性化された結合員に与える。

#### Ⅷ. 結 論

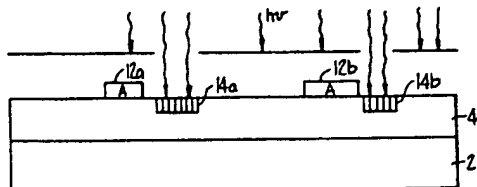
本発明は、基体上でポリマーを合成するための非常に改良された方法及び装置に関する。前記の記載は例示的なものであって制限的なものではないことが意図される。前記の記載を概観した後、当業者には多くの態様が自明であろう。例として、本発明は主として光除去可能な保護基の使用に言及して記載されているが、光以外の他の放射源を使用し得ることが当業者に容易に認識されるであろう。例えば、幾つかの態様において、電子ビーム照射、X-線照射(電子ビームリソグラフとの組合せにおける)、又はX-線リソグラフィー技法に対して選択的である保護基を用いるのが望ましいであろう。あるいは、電流への暴露により基を除去することができよう。従って本発明の範囲は、前記の記載によって決定されるべきではなく、添付された請求の範囲及び該請求の範囲に均等な全範囲に関して決定されるべきである。



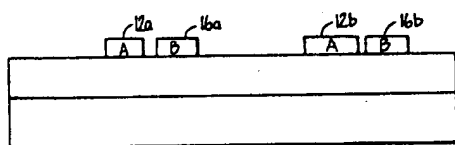
**FIG. 1.**



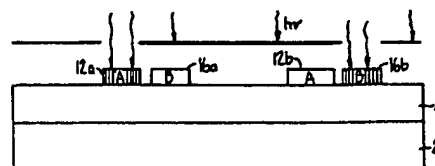
**FIG. 2.**



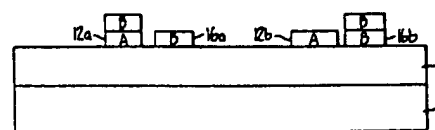
**FIG. 3.**



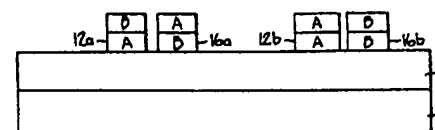
**FIG. 4.**



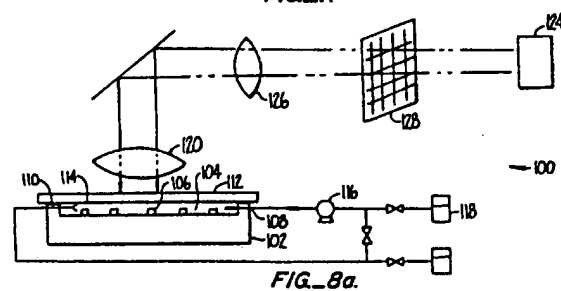
**FIG. 5.**



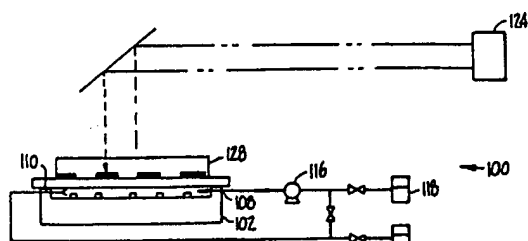
**FIG. 6.**



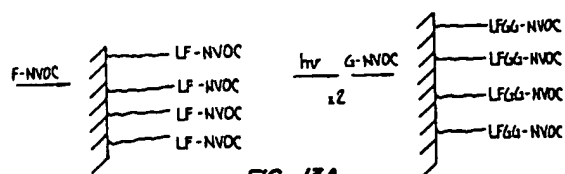
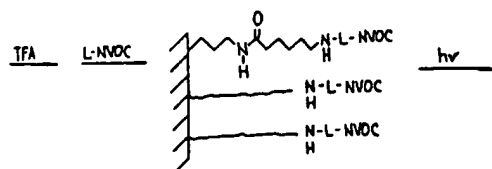
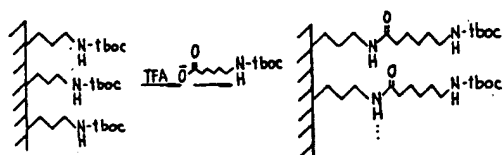
**FIG. 7.**



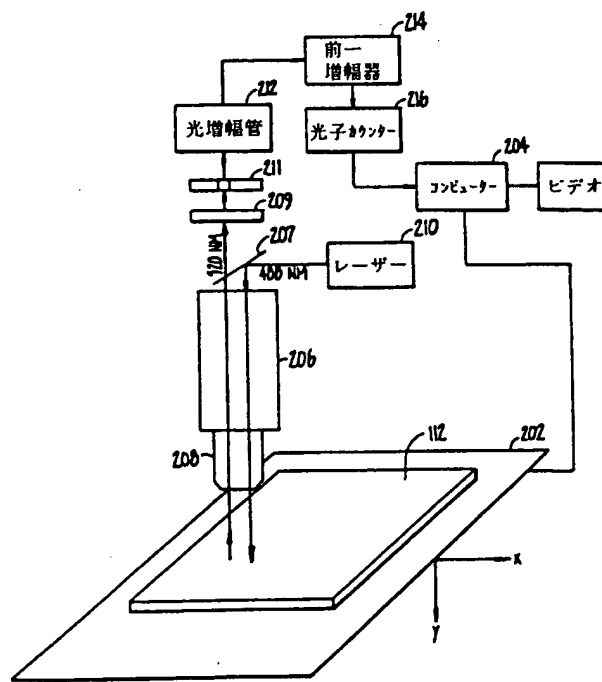
**FIG\_8a.**



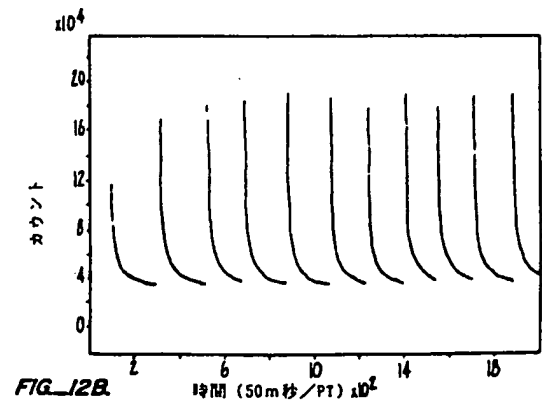
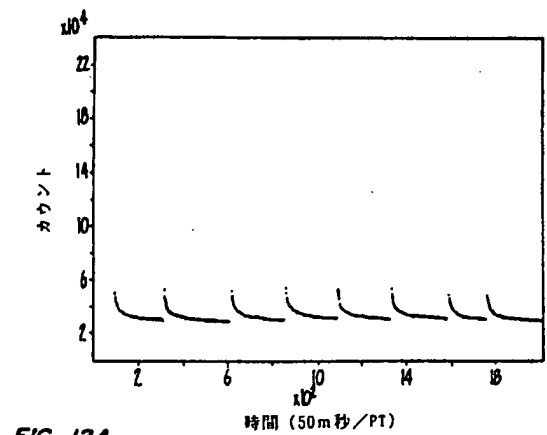
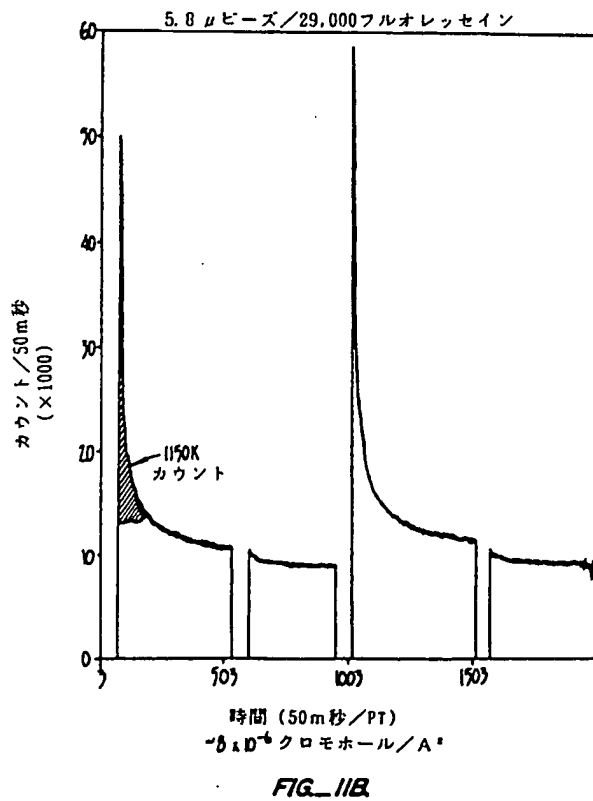
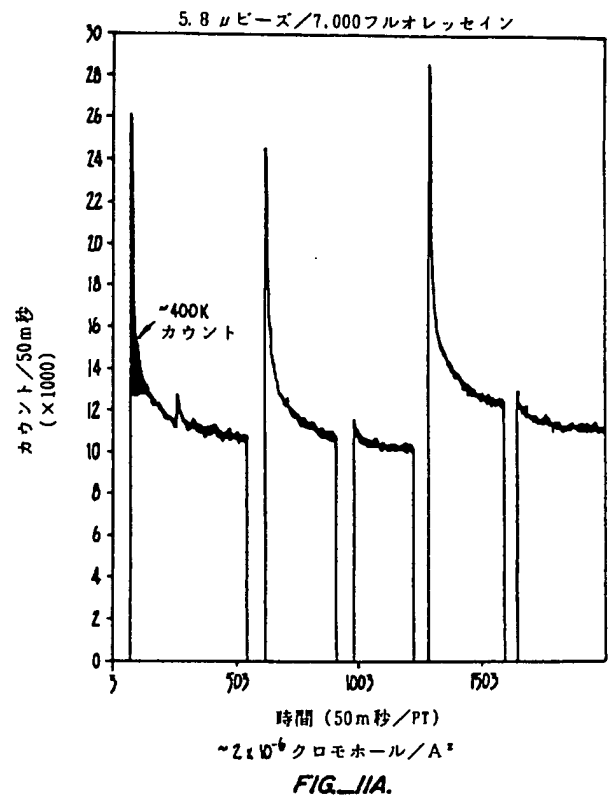
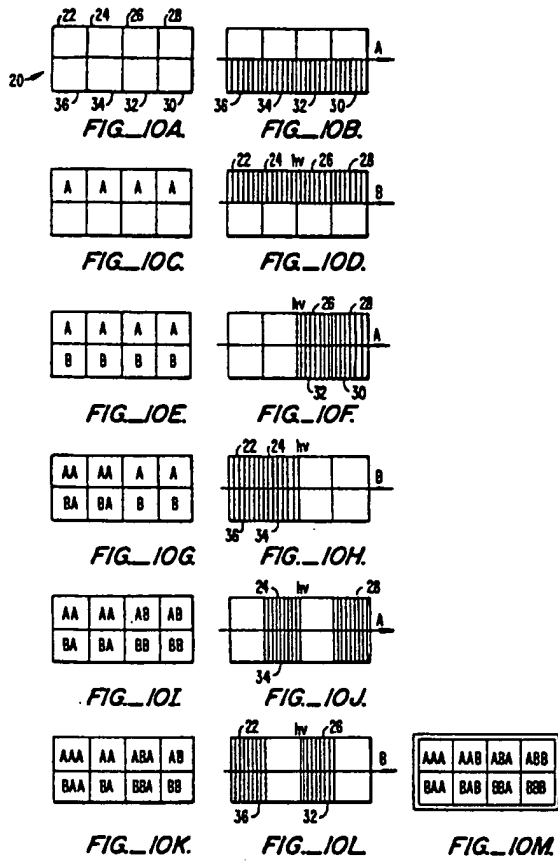
**FIG. 8b**



**FIG. 13A.**



**FIG. 9.**



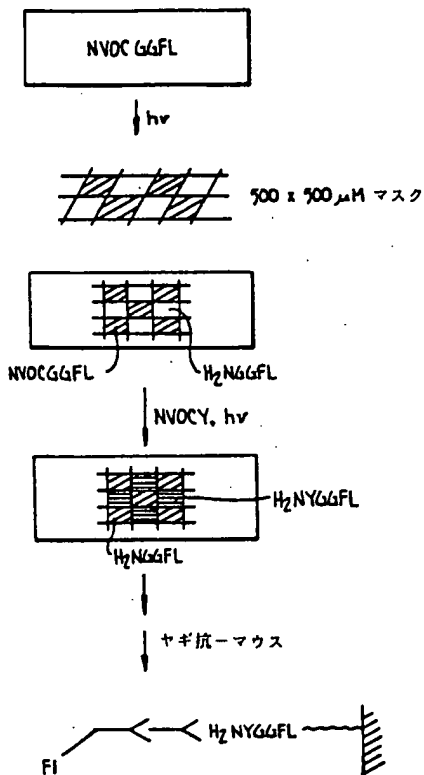


FIG. 13B

P	A	S	G	
<u>L</u> GFL	<u>L</u> A GFL	<u>L</u> S GFL	<u>L</u> G GFL	L
<u>F</u> GFL	<u>F</u> A GFL	<u>F</u> S GFL	<u>F</u> G GFL	F
<u>W</u> GFL	<u>W</u> A GFL	<u>W</u> S GFL	<u>W</u> G GFL	W
<u>Y</u> GFL	<u>Y</u> A GFL	<u>Y</u> S GFL	<u>Y</u> G GFL	Y

FIG. 14A.

P	a	s	G	
<u>Y</u> p GFL	<u>Y</u> a GFL	<u>Y</u> s GFL	<u>Y</u> G GFL	Y
<u>f</u> p GFL	<u>f</u> a GFL	<u>f</u> s GFL	<u>f</u> G GFL	f
<u>w</u> p GFL	<u>w</u> a GFL	<u>w</u> s GFL	<u>w</u> G GFL	w
<u>y</u> p GFL	<u>y</u> a GFL	<u>y</u> s GFL	<u>y</u> G GFL	y

FIG. 14B.

補正書の翻訳文提出書  
(特許法第184条の8)

平成3年12月7日

特許庁長官 深 沢 亘 殿

## 1 特許出願の表示

PCT/NL90/00081

## 2 発明の名称

非常に大規模な固定化ペプチド合成

## 3 特許出願人

住 所 オランダ領アンティル、キュラコ、  
デ リュイデルカデ 62  
名 称 アフィマックス テクノロジーズ  
ナームロゼ ベノートスハップ

## 4 代理人

住 所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号静光虎ノ門ビル  
〒105 電話 (3504) 0721  
氏 名 弁護士 (6579) 青 木 朗  
(外4名)

## 5 補正書の提出年月日

1991年7月24日

## 6 添付書類の目録

補正書の翻訳文

## 34条補正

1. 単一の基体表面上の知られた場所で種々の化学配列を製造する方法であって、

(a) 基体の選択された領域をアクチベーターに暴露することにより保護基を除去する；

(b) 除去可能な保護基を有するモノマーに前記領域を暴露する；

(c) 階段 (a) 及び (b) を反復し、ここで前記選択された領域が同一の又は異なる領域であり、そして前記モノマーが同一の又は異なるモノマーであって前記基体上で種々の配列を合成する；

ことを含んで成る方法。

## 國際調查報告

International Application No. PCT/NL 90/00081

L. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (in accordance with the classification system used, indicate all)	
According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classification and IPC	
IPC <sup>5</sup> : C 07 K 1/04, 17/06, 17/14, B 01 J 19/00	
N. FIELDS SEARCHED	
Maximum Documentation Searched	
Classification System	
IPC <sup>5</sup> : C 07 K, B 01 J	
Documentation Searched other than Maximum Documentation	
to the extent that such documents are included in the Fields Searched	
M. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	Chemical Abstracts, volume 110, no. 9, 1-5,9 27 February 1989, (Columbus, Ohio, US), V.K. Haridasan et al.: "Peptide synthesis using photolytically cleavable 2-nitrobenzylloxycarbonyl protecting group", see page 707, abstract 76031w, & Proc. Indian Natl. Sci. Acad., Part A 1987, 53(6), 717-28 (Eng).
A	Chemical Abstracts, volume 100, no. 17, 1 23 April 1984, (Columbus, Ohio, US), W. Stueber et al.: "Synthesis and photolytic cleavage of bovine insulin B22-30 on a nitrobenzylglycyl-poly (ethylene glycol) support", see page 700, abstract 139591v, & Int. J. pept. Protein Res. 1983, 22(3), 277-83 (Eng).
<p>* Symbol categories of cited documents:</p> <p>"A" document published in the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"X" document published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the published state of another document or other control reason (see Appendix)</p> <p>"P" document published in an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"N" document published prior to the international filing date but after the priority date claimed</p> <p>"I" later document published after the international filing date of priority date and not in conflict with the invention but used to interpret the principles or theory underlying the invention</p> <p>"E" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"T" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu- ments, said combination being intended to be a person skilled in the art</p> <p>"G" document member of the same patent family</p>	
IV. CERTIFICATION	
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
18th September 1990	18 OCT 1990
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE	JOSS T. TAZELAAR

Form PCT/ISA (115) (revised sheet) (January 1989)

International Application No. PCT/NL 90/00081

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	IBM Technical Disclosure Bulletin, volume 9, no. 11, April 1967, M.F. Levy: "Preparing additive printed circuits", page 1473, see the whole article	1
A	Chemical Abstracts, volume 91, no. 22, 1 December 1980, (Columbus, Ohio, US), M. Gizard et al.: "Lithographic technique using radiation-induced grafting of acrylic acid into poly (methyl methacrylate) films", see page 585, abstract 213252r, & Polym. Eng. Sci. 1980, 20(16), 1069-72 (Eng).	1
A	J. Vac. Sci. Technol., volume B1, no. 4, October-December 1983, American Vacuum Society, M. Morita et al.: "Direct pattern fabrication on silicone resin by vapor phase electron beam polymerization", page 1171 see the whole article	1
P,X	EP, A, 0328256 (OWENS-CORNING) 16 August 1989 see the whole text, especially example 12	38-43

Form PCT/ISA 210 (extra sheet) (January 1989)

## 國際調查報告

NL 9000081  
SA 37813

This entry lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file as of 15/10/90.  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0328256	16-08-89	JP-A- 2006750	10-01-90

For more details about the entry: see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/91



第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号
G 01 N 33/53	U	8310-2 J
33/536		8310-2 J
33/541		8310-2 J
// C 07 K 7/06	Z	8318-4 H
C 07 K 99:00		

優先権主張 ⑥1990年3月7日③米国(U S)④492,462

⑦発明者	リード, ジェイ. レイトン	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94301, パロ アルト, ラモナ 1001
⑦発明者	フオドア, ステイブソン ビー. エー.	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94303, パロ アルト, ウィンターグリーン ウェイ 817
⑦発明者	ストライア, ルバート	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94305, スタンフォード, ソノマ テラス 843